



TITLE:

混合ビタミン剤並びに食品中のビタミンDの定量法に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

足立, 昌子

CITATION:

足立, 昌子. 混合ビタミン剤並びに食品中のビタミンDの定量法に関する研究. 京都大学, 1979, 薬学博士

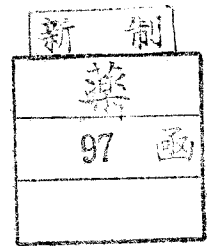
ISSUE DATE:

1979-11-24

URL:

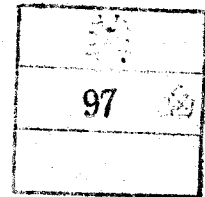
<https://doi.org/10.14989/doctor.r4002>

RIGHT:



混合ビタミン剤並びに食品中の
ビタミンDの定量法に関する研究

足立昌子



目 次

第1章	ビタミンD定量法の現況とその問題点	1
第2章	ガスクロマトグラフィーによるビタミンDの定量	6
2.1	市販混合ビタミン剤中のビタミンD ₂ の定量	6
2.1.1	通常の混合ビタミン剤	7
2.1.1.1	検量線	7
2.1.1.2	けん化の条件の検討	7
2.1.1.3	TLCの条件の検討	8
2.1.1.4	標準D ₂ 、A並びにEの混合物中におけるD ₂ の定量結果	8
2.1.1.5	市販混合ビタミン剤中のD ₂ の定量値	10
2.1.2	ビタミンEを多量に含む混合ビタミン剤	11
2.1.2.1	標準D ₂ 、E混合物中におけるD ₂ の定量結果	12
2.1.2.2	市販混合ビタミン剤中のD ₂ の定量値	13
2.1.3	比色法との比較検討結果	13
2.1.4	保存試験の結果	14
2.2	マグロ肝油並びにビタミンD ₃ 樹脂油中のビタミンD ₃ の定量	16
2.2.1	D並びに内部標準物質のガスクロマトグラフィー	17
2.2.2	検量線	17
2.2.3	マグロ肝油のガスクロマトグラフィーによるD ₃ の定量	17
2.2.4	D ₃ 樹脂油のガスクロマトグラフィーによるD ₃ の定量	20
2.3	照射乾燥酵母中のビタミンD ₂ の定量	21
2.3.1	検量線	21
2.3.2	照射乾燥酵母のガスクロマトグラフィーによるD ₂ の定量	21
2.3.3	照射紫外線量とD ₂ の生成量との関係	22
2.4	照射シイタケ中のビタミンD ₂ の定量	24
2.4.1	照射シイタケのガスクロマトグラフィーによるD ₂ の定量	24
2.4.2	照射紫外線量とD ₂ の生成量との関係	26
2.4.3	シイタケ中のD ₂ 含量	26
2.5	小 括	27

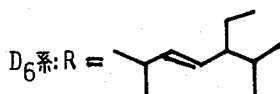
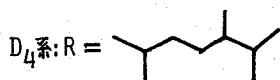
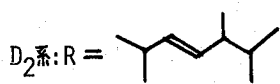
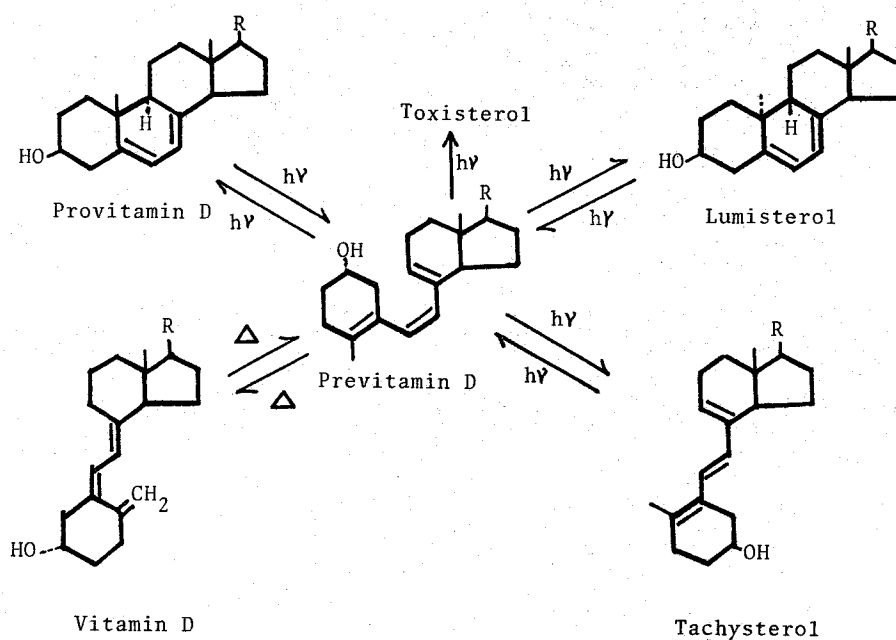
第3章 高速液体クロマトグラフィーによるビタミンDの定量	29
3.1 市販混合ビタミン剤中のビタミンD ₂ の定量	29
3.1.1 通常の混合ビタミン剤	29
3.1.1.1 検量線	29
3.1.1.2 市販混合ビタミン剤の高速液体クロマトグラフィーによるD ₂ の定量	30
3.1.1.3 GLC法との比較	30
3.1.2 ビタミンEを多量に含む混合ビタミン剤	31
3.1.2.1 市販混合ビタミン剤の高速液体クロマトグラフィーによるD ₂ の定量	31
3.1.2.2 GLC法との比較	33
3.2 マグロ肝油並びにビタミンD ₃ の定量	33
3.2.1 マグロ肝油の高速液体クロマトグラフィーによるD ₃ の定量	33
3.2.2 D ₃ 樹脂油の高速液体クロマトグラフィーによるD ₃ の定量	34
3.2.3 GLC法との比較	35
3.3 照射乾燥酵母中のビタミンD ₂ の定量	36
3.3.1 照射乾燥酵母の高速液体クロマトグラフィーによるD ₂ の定量	36
3.3.2 GLC法との比較	37
3.4 照射シイタケ中のビタミンD ₂ の定量	37
3.4.1 照射シイタケの高速液体クロマトグラフィーによるD ₂ の定量	37
3.4.2 GLC法との比較	38
3.5 牛乳並びに母乳中のビタミンDの定量	39
3.5.1 牛乳中のD ₃ の定量	39
3.5.2 母乳中のDの定量	41
3.5.3 UV照射によるD ₃ 生成量の検討	42
3.5.4 GC-MS分析による牛乳中のD ₃ の確認	42
3.5.5 D硫酸エステルについての検討	42
3.6 小 括	43
第4章 ガスクロマトグラフィー並びに高速液体クロマトグラフィーによるプロビタミンD の定量	45
4.1 乾燥酵母中のエルゴステロールの定量	45
4.1.1 検量線	45
4.1.2 無照射乾燥酵母のガスクロマトグラフィーによるエルゴステロールの定量	46

4.1.3	無照射乾燥酵母の高速液体クロマトグラフィーによるエルゴステロール の定量	47
4.1.4	GLC法との比較	47
4.2	シイタケ中のエルゴステロールの定量	49
4.2.1	シイタケのガスクロマトグラフィーによるエルゴステロールの定量	49
4.2.2	シイタケの高速液体クロマトグラフィーによるエルゴステロールの定量	50
4.3	牛乳中のプロビタミンDの定量	50
4.3.1	牛乳の高速液体クロマトグラフィーによるプロDの定量	51
4.3.2	GC-MS分析による牛乳中の7-DHCの確認	53
4.4	小 括	53
第5章	総 括	55
謝 辞		59
実 験 の 部		60
第2章に関する実験		60
第3章に関する実験		65
第4章に関する実験		69
文 献		72

第1章 ビタミンD 定量法の現況とその問題点

ビタミンD（以下Dと略す。）は抗くる病成分で、一般にはプロビタミンD（プロD）の紫外線照射によって得られる。プロDはFig. 1に示すような5,7-ジエンステロールの骨格を有し、紫外線照射によって9, 10位間での開環が起こり、プレビタミンD（プレD）に変わる。このさいル

Fig. 1 UV irradiation of pro-D



ミステロール、タチステロール、トキシステロールなどが副生する。プレDよりDへの異性化反応は光によらず、溶液状態での単なる加熱で起こり、この反応は可逆反応である。Fig. 1に示すような光および熱異性化反応は、5.7-ジエンステロールであれば側鎖構造が異なっていても同様に起こり、同様の反応成績体を与える。生成したD型の化合物の抗くる病活性には側鎖構造が関与するために、プロDおよびプレDとして定義されるものの数は少ない。現在までにFig. 1に示すようにプロD₂～D₇がプロDとして認められておりそれぞれの紫外線照射によってD₂～D₇が得られている。しかしこれらのうち高い生物活性を示すものはD₂とD₃のみであり、その他は実用的にはほとんど顧みられていない。なおプロDではプロD₂、プロD₃といった名称よりもエルゴステロール(ERG)、7-デヒドロコレステロール(7-DHC)の方が一般化されているのでそれらを使用することにした。

D₂とD₃は哺乳類に対してはほぼ同等の生物効力を示すが、鳥類に対してはD₃のみが有効であり、D₂はD₃の1/10以下の抗くる病効力を示すにすぎない。そこでDの生物効力単位はD₃を標準物質とし、D₃の0.025 μgに相当する効力を1 I.U. とすると1949年にWHOで定められている。前述のようにプロDの冷時UV照射溶液中に最初に生成するプレDは単なる加熱操作でDに異性化される。一方Dの溶液を加熱した時もプレDが生成し、両者間の反応は可逆的な熱異性化反応であり、 $\text{プレD} \rightleftharpoons \text{D}$ の平衡状態に到達するまで異性化は進行する。この反応速度は温度のみに依存し、溶媒の種類、光、触媒などには影響されない。このようにDが加熱によって一部が容易にプレDに変わるという性質は、Dの定量において重大な問題である。なぜなら、ある試料中にDとプレDがある含量比で存在していたとしても、この比は試料の保存中に徐々に変化するであろうし、また定量操作において必要不可欠のけん化操作によっても変化してしまうからである。

Keeverling Buisman ら¹⁾はDのみの定量値を“actual D値”そしてDとプレDの定量値の合計を“potential D値”と定義し、actual D値を定量することは上記の理由で困難であり、プレD自身の生物効力は低い、体内でDに転換する可能性もあるので、DとプレDの合計値である potential D値を定量することが試料中のDを評価するための最善の策ではないかと提案している。著者もこの提案に同調し、以下、広義のDである potential D を求めることにした。

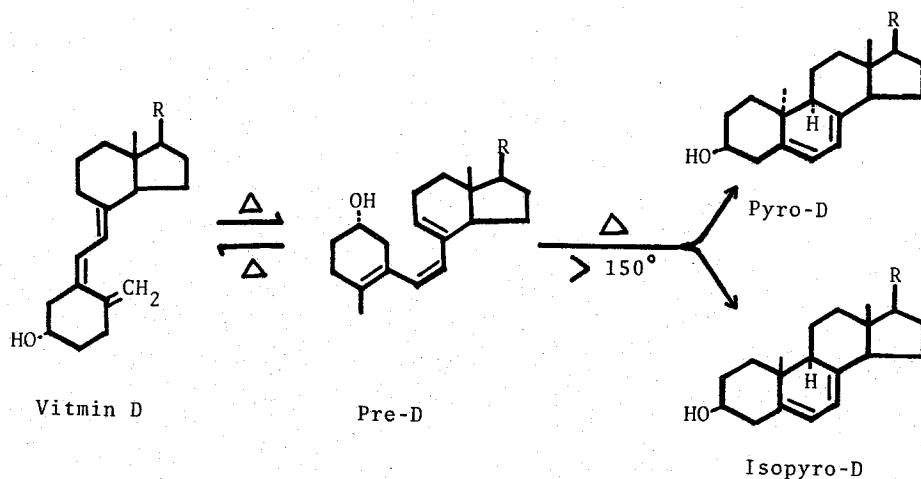
薬品及び食品中のDを定量することは製剤学の面からも、またDの栄養、代謝の研究や、国民の栄養状態を調査するなど保健衛生の見地からも非常に重要なことである。DはビタミンA(A)とともに最も古くから知られた脂溶性ビタミンの1つであり、この両者は水溶性ビタミンのB₁、B₂、C、ナイアシンとともに栄養学的に最も重要なビタミンと考えられてきた。D以外の5つのビタミンは比較的、早くから理化学的定量法が開発されたのに対して、Dに関しては、かなり多くの人々の

努力があつたにもかかわらず、容易に成功せず、最近まで動物試験法によることが多かった。動物試験法では飼育、飼料にむつかしい条件があるばかりでなく、試験期間が長期にわたる（ネズミでは、1ヶ月以上、ヒナの場合でも3週間を要する。）という欠点があり簡便ではない。1960年になってUSP²⁾にようやく動物試験法の代りに、Nield呈色反応（試料を塩化アセチルを含む三塩化アンチモンとクロロホルムまたは塩化エチレン溶液中で反応させる。）を利用する比色定量法が採用されるようになった。Nield呈色試薬³⁾はDの呈色試薬のうちで 実用的に使用されている唯一のものである。しかしながらA、ステロール等も同様に呈色するためにこれら妨害物の除去を完全にする必要がある。Mulder ら⁴⁾、上田ら⁵⁾は各々3段階の カラムクロマトグラフィーで精製後、比色法により混合ビタミン剤中のDを定量している。著者もこれらの定量法を追試検討したが、日常使用するには操作が非常に煩雑である。このように混合ビタミン剤、食品等に含まれるDを理化学的な方法で迅速且つ正確に定量することの困難な理由として、Dの生物効力が非常に高く（1 $\mu\text{g} = 40 \text{ I.U.}$ 、ヒトの所要量は幼児の場合が最大で1日400 I.U.）、そのために常に微量定量が要求されることや、Dの定量に利用できるような特異反応が発見されないために妨害物質として混在する多量のA、ビタミンE（E）、ステロール等の影響を除かなければならないことがあげられる。Dの生化学面での最近のめざましい研究の発展とは対照的にDの理化学的定量法の確立の立ちおくれは大きい。このため栄養学、公衆衛生学、製剤学等における研究の発展がさまたげられてきた。その基本となる定量法の確立が強く要望されている背景の中で著者は迅速且つ正確な定量法を確立することを計画した。

1960年 Ziffer⁶⁾ らはGLCの条件下でDは熱閉環を起こし、pyro-Dとisopyro-Dの2つのピークを与えることを観察した。ついでAvioli⁷⁾ らはGLCにおいてDは定量的にpyro-Dとisopyro-Dになることから、いずれのピークもDの定量に利用できることを見い出した。Dを真空封管中または高沸点溶媒の溶液として150°C以上の温度で加熱するとき、9、10位間で閉環したpyro-Dとisopyro-Dとに異性化される。この反応はプレDを同様の条件で加熱しても起こる。（Fig. 2）このようにGLCにおいてDとプレDは全く同一挙動で熱閉環して定量的にpyro-Dとisopyro-Dに基づくピークを与えるので、いずれかのピークを利用して定量すれば、DとプレDの合計値のpotential D値が求められるので便利である。しかし、水素炎イオン化検出器を用いるGLCはそのDの検出限界が約10 ngであり、比較的Dを多く含む混合ビタミン剤などには適当であろう。しかし、Dをごく微量しか含まない食品の分析においては、試料採取量が非常に多くなり、簡単に入手出来る試料の場合には支障ないが、母乳のように入手困難なものの場合にはこの方法は利用できない。そこで感度の面ですぐれている（Dに対して、検出限界は約2 ngである。）HPLCにも注目し、GLCとHPLCを用いて検討することにした。

Fig. 2

Thermal isomerization of D



HPLCを用いたDの定量に関しては Tartivita⁸⁾(D₃樹脂油), Tomkins⁹⁾ら(ゼラチンで被われたA acetateとD₂顆粒)月田¹⁰⁾ら(D₂異性体) Hofsass¹¹⁾ら(D₃樹脂油)並びに Thompson¹²⁾ら(強化牛乳)の報告があるが, その適用はD含量の非常に多い特定のものに限られており, 食品一般に適用される定量法の報告は全くみられない。また栄養学の観点からも一般の食品にも広く利用出来る定量法を確立することが必要である。そこで著者は本研究を行った。

著者が研究の対象とした製剤並びに食品を Table 1 に示した。Dを含む食品は非常に限定されており, いずれもその代表的なものである。また別にプロDのERGを多量に含む植物性食品例えば, 茸類, 酵母もUV照射すればDが生成するので, 照射試料を定量の対象に選ぶと共に, これらの試料中に含まれるプロDの定量についても検討した。また, GLC法とHPLC法とによって得られた結果を比較し, これまで全く報告されていなかった両者の相関性を明らかにした。

Table 1 Samples for the determination of vitamin D and pro-vitamin D by GLC and HPLC methods

Sample	Characteristic
Multivitamins preparations I (Usual preparations)	E/D ≤ 2,500
Multivitamins preparations II (Containing excess amounts of vitamin E)	E/D > 2,500

Tuna liver oils	Containing large amounts of vitamin D
Vitamin D ₃ resin oils	UV irradiated product of 7-dehydrocholesterol
Dried yeast	Containing large amounts of ergosterol
Dried shiitake	Containing large amounts of ergosterol
Cow's and Human milks	Containing small amounts of vitamin D

第2章 ガスクロマトグラフィーによるビタミンDの定量

2.1. 市販混合ビタミン剤中のビタミンD₂の定量

一般に混合ビタミン剤に配合されているDはA, Eとの共存下にある場合が多く, Dに対するA, Eの配合量が非常に大きい。現在日本で市販されている混合ビタミン剤(a~u)中の各々の配合比を調べて表にまとめた。(Table 2) A/DではI.U.比で2~12.5の範囲にある。E/Dでは重量比で100~2,000の範囲がほとんどであるが, 例外的に2,500以上が2, 3見受けられた。GLC法ではFig. 3に示すようにpyro-D₂もpyro-D₃もA, Eから分離されるので比色

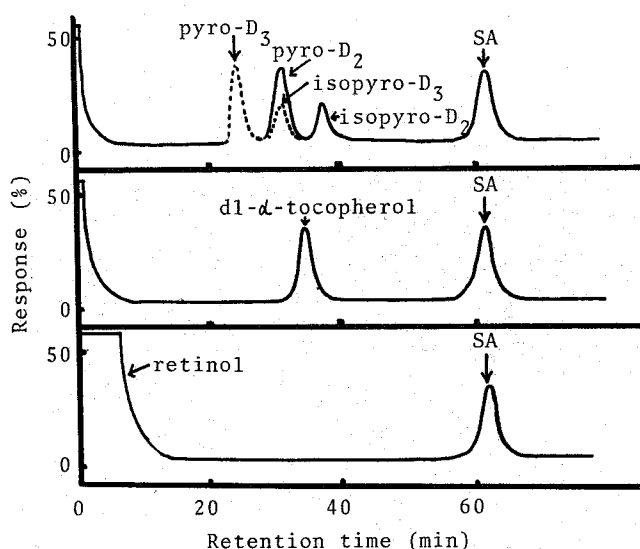
Table 2 Ratios of vitamin A (I.U. ratio) and vitamin E (weight ratio) to vitamin D in commercial multivitamin preparations on sale in Japan.

Multivitamin preparation	A/D (I.U. ratio)	E/D (weight ratio)	Multivitamin preparation	A/D (I.U. ratio)	E/D (weight ratio)
a	5	—	l	2	800
b	10	—	m	10	800
c	10	100	n	5	1,000
d	10	120	o	10	1,000
e	10	160	p	12.5	1,000
f	12.5	200	q	10	1,200
g	10	400	r	10	1,600
h	12.5	400	s	10	2,000
i	5	500	t	5	5,000
j	10	500	u	10	13,333
k	10	600			

法におけるような完全な妨害物の除去操作を行う必要はないが, A, Eの量が多くなると妨害を受けるので, ある程度妨害物の除去を行う必要がある。月田¹³⁾らは試料の不けん化物をHClで処理してAの大部分をanhydro-Aに変えたのち, TLCで妨害物を除去し, 次いでGLCを行う方法を報告しているが, 標準品についての検討にとどまり, その実際面への応用は全く行っていない。Hommes¹⁴⁾らは2段階のカラムクロマトグラフィー, TLCにより精製後iso-Dに異性化し, GLC法で製剤中のDの定量を行っているが, 非常に操作が煩雑である。このように混合ビタミン剤中のDの定量にGLC法を適用した報告は数少なく, しかもそれらは, 非常に煩雑な前処理操作とかなりの時間を要し簡便な方法とは言いがたい。そこで, 著者はより簡便な前処理方法を検討した結果, 吸着剤にKieselgl G F 254, 展開溶媒にn-ヘキサン・酢酸エチル(4:1)を用い

Fig. 3

Gas chromatograms of D_2 , D_3 , A and E



たTLCによって、HCl処理などの操作を行うことなくA、E等の妨害物を簡単に除去出来ることを確認した。なお、日本で販売されている混合ビタミン剤はすべてDとして D_2 を含んでいる。

2.1.1 通常の混合ビタミン剤

定量操作法の概略はけん化及び不けん化物の分離→TLC→GLCである。以下定量法を確立するに至るまでの基本的な検討事項から順に述べる。

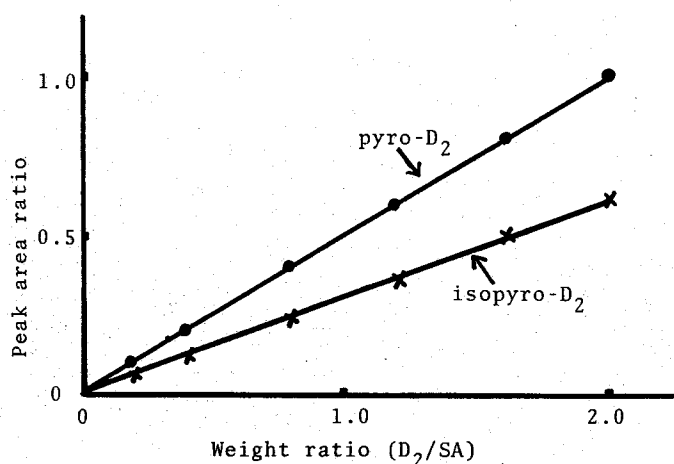
2.1.1.1 検量線

標準 D_2 10, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とSA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むアセトン溶液を第2章に関する実験の定量操作法の1)の③(P 62)に設定した条件でGLCに適用したところ、Fig. 4に示す検量線が得られた。このように D_2 は熱閉環をおこし、一定条件下では定量的にpyro- D_2 とisopyro- D_2 になる。生成したpyro- D_2 とisopyro- D_2 の比率は、1.7 : 1でpyro- D_2 の方が大きいので定量はpyro- D_2 のピークを用いることにした。

2.1.1.2 けん化の条件の検討

標準 D_2 (8,000 IU), A palmitate (55,000 IU)とE (60 mg)の混合物を作り、けん化条件の検討を行った。抗酸化剤を加えないでけん化を行い D_2 を定量したところ、Eの分解物に由

Fig. 4

Calibration curves of D_2 by GLC

来するピークがpyro- D_2 のピークを妨害した。(Fig. 5 (I))そこで抗酸化剤を種々検討した結果, 20%ピロガロール・エタノール溶液が最も有効であることがわかった。(Fig. 5 (II))

2.1.1.3 TLCの条件の検討

TLCの条件を精査し, 吸着剤にKieselgel GF₂₅₄, 展開溶媒にn-ヘキサン・酢酸エチル(4:1)を使用すれば, A, E等の妨害物を簡単に除去できることを確認した。Fig. 6にこの条件下での標準 D_2 , A, E混合物の不けん化物の薄層クロマトグラムを示す。実線は明確に確認出来たスポットであり, 点線はうすいスポットである。

2.1.1.4 標準 D_2 , A並びにEの混合物中における D_2 の定量結果

D_2 (8,000 IU), A palmitate (55,000 IU)とE (60mg)の混合物につき第2章に関する実験の定量操作法の1) (P61)に従い操作を行い D_2 の回収率を求めたところTable 3に示すように満足な結果が得られた。従って前述の検量線は前処理操作を行わないものであるが, 前処理操作による補正は行わず, そのまま使用しても支障はないと考えた。又, Table 4に示すようにA/DがIU比で104以下, E/Dが重量比で2,500以下であるなら, A, Eの混在は上記のTLCによる前処理操作を用いた定量を妨害しなかった。日本で市販されている大部分の混合ビタミン剤のA/D及びE/Dは前記の制限を大きく下回っているので, 本法は通常の混合ビタミン剤に対してならば広く一般的な定量法として使用可能である。例外的にE/Dが2,500を超える混合ビタミン剤も2, 3見受けられたが, このような場合でもTLCの前にMulder⁴⁾らのPTA (Phosphate-treated alumina) カラムクロマトグラフィーを行えばEの影響を除去でき

Fig. 5 Gas chromatograms of model preparations

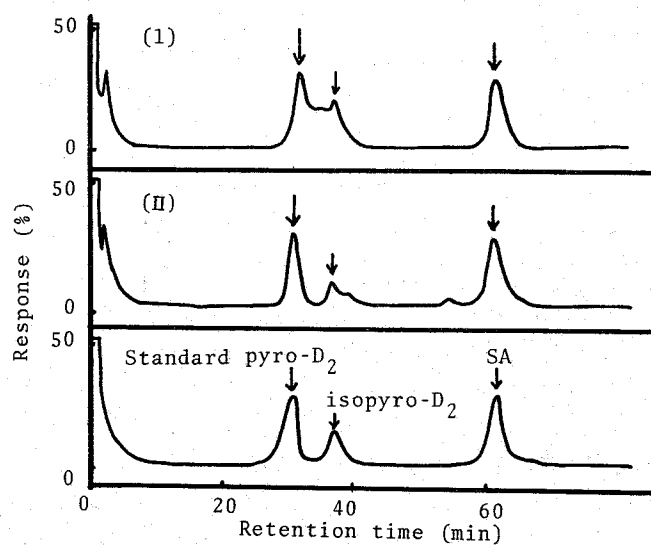
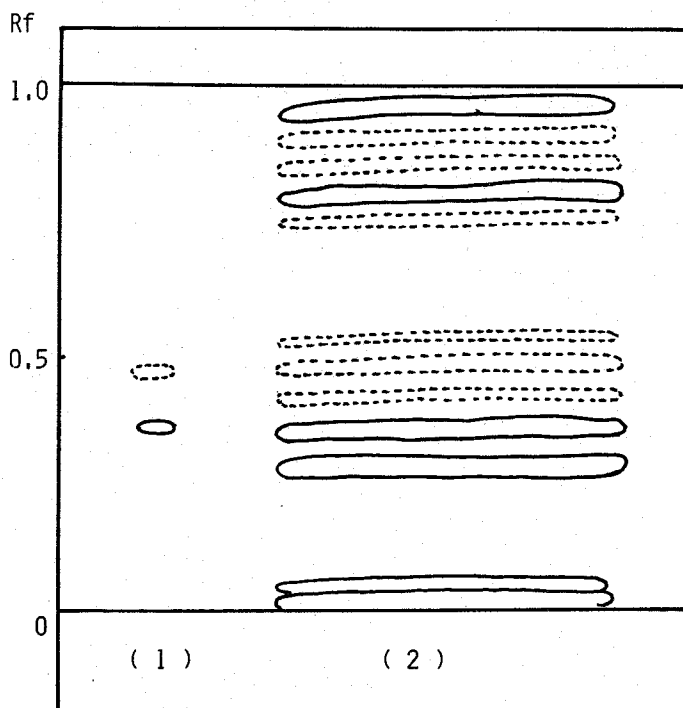


Fig. 6 Thin-layer chromatograms of a model preparation.



- (1) Reference solution for TLC (D_2 +pre- D_2)
 (2) The unsaponifiable matters of a model preparation made by mixing D_2 (8000IU), A palmitate(55000IU) and E(60mg)

ることも確認した。これについては次項で述べる。

Table 3 Recovery of vitamin D₂ in a model preparation.

Trial	Vitamin D ₂		Recovery (%)
	Added value (I.U.)	Estimated value (I.U.)	
1	8,000	8,056	100.7
2	8,000	7,736	96.7
3	8,000	8,008	100.1
4	8,000	7,752	96.9
M±SD			98.6±1.8

Note: The model preparation was made by mixing vitamin D₂ (8,000 I.U.), A palmitate (55,000 I.U.) and E (60 mg).

Table 4 Influences of vitamin A and E on the determination of vitamin D₂.

Vitamin D ₂ (I.U.)	A/D (I.U. ratio)	E/D (Weight ratio)	Recovery (%)
8,000	41.7	—	99.4
8,000	104.2	—	95.8
8,000	208.3	—	impossible
8,000	—	1,000	95.5
8,000	—	2,500	96.8
8,000	—	5,000	impossible
8,000	—	10,000	impossible

Note: The model preparations were made by mixing vitamin D₂ (8,000 I.U.) and vitamin A palmitate or E.

2.1.1.5 市販混合ビタミン剤中のD₂の定量値

市販混合ビタミン剤(試料No.1~5)を薬局より購入直後、第2章に関する実験の定量操作法の1)(p61)に従い繰り返しD₂を定量した。Fig. 7に定量した際のガスクロマトグラムを示した。いずれの場合にも妨害物による影響を受けることなく定量可能であった。定量値をTable 5に示した。いずれにおいても定量値間のバラツキは少なく良好な結果が得られた。バラツキを動物試験法と比較すると、動物試験法では変動係数は10.0%¹⁵⁾であるのに対し、著者の方法では4.2%であった。

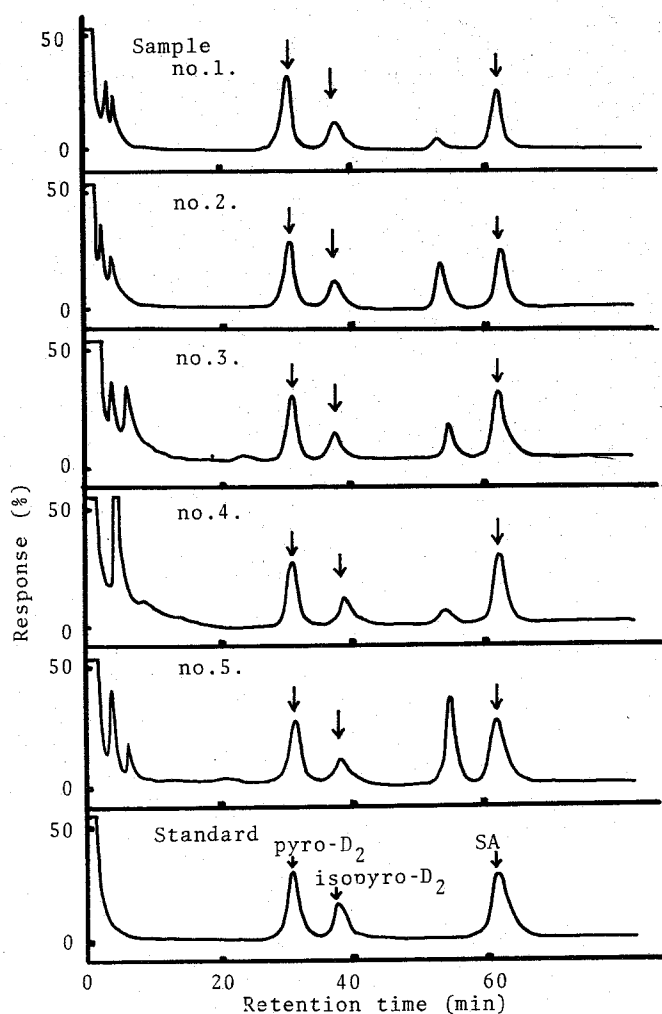
Table 5 Vitamin D₂ content in commercial multivitamin preparations

Sample	Vitamin D ₂ content		
	Indicated	No. of assay	Found (M±SD)

No.1	250 IU/tab.	4	266 ± 4
No.2	400 IU/cap.	5	404 ± 9
No.3	200 IU/tab.	5	206 ± 17
No.4	400 IU/3 tab.	4	422 ± 25
No.5	250 IU/cap.	4	304 ± 10

Fig. 7.

Gas chromatograms of commercial multivitamin preparations



2.1.2 ビタミンEを多量に含む混合ビタミン剤

定量操作法の概略はけん化及び不けん化物の分離→Phosphate-treated alumina(PTA)

カラムクロマトグラフィー→TLC→GLCである。

2.1.2.1 標準D₂，E混合物中におけるD₂の定量結果

D₂ (8,000 IU) と E を各々 1,000 mg と 2,000 mg の混合物につき第2章に関する実験の定量操作法の2) (P 63) に従いD₂の回収率を求めた。Fig. 8(I)はD₂ (8,000 IU) と E 1,000 mg の混合物につき通常の混合ビタミン剤の場合と同様の操作法を行った結果である。pyro-D₂ のピークは妨害を受けて定量不可能であった。Fig. 8(II)は上記混合物につきPTAカラムクロマトグラフィー (P 63) を適用した結果である。妨害物は除去され定量可能となった。定量値を Table 6 に示した。両者共に回収率はほぼ100%に近く、結果は満足すべきものであった。

Fig. 8 Gas chromatograms of model preparations

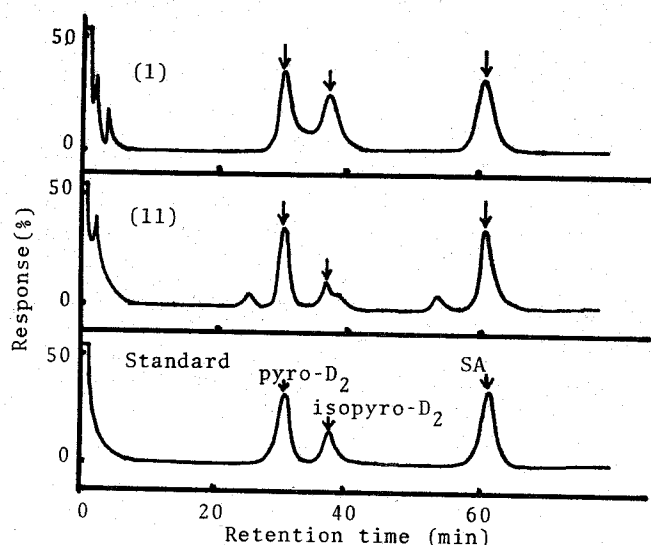


Table 6 Recovery of vitamin D₂ in model preparations.

Model preparation	Trial	Vitamin D ₂		Recovery (%)
		Added value (I.U.)	Assayed value (I.U.)	
No. 1 (E/D=5,000)	1	8,000	7,936	99.2
	2	8,000	7,968	99.6
Mean			7,952	99.4
No. 2 (E/D=10,000)	1	8,000	7,913	98.9
	2	8,000	7,800	98.5
Mean			7,857	98.7

Note: The model preparations Nos.1 and 2 were made by mixing 8,000 I.U. (0.2 mg) of vitamin D₂ with 1,000 and 2,000 mg of vitamin E (*dl*- α -tocopheryl acetate), respectively.

2.1.2.2 市販混合ビタミン剤中のD₂の定量値

市販混合ビタミン剤試料No.6につき通常の混合ビタミン剤に適用される操作法(p 61)を行った時のガスクロマトグラムをFig.9 (I)に示した。標準品の場合と同様に pyro-D₂ のピークは妨害を受け定量不可能であった。Fig.9 (II)は上記試料につきP T Aカラムクロマトグラフィーの操作を加えた場合である。妨害物は除去され、定量可能となった。Table 7 に示した定量値もバラツキは小さく、良好な結果が得られた。

Fig. 9 Gas chromatograms of commercial multivitamin preparation (Sample no.6)

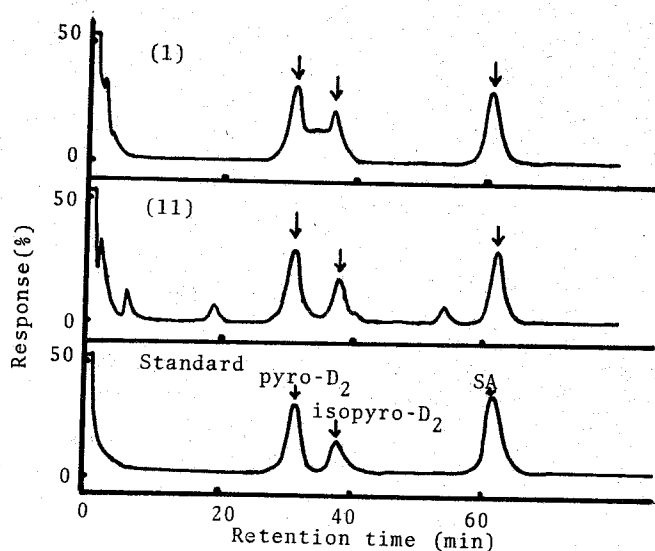


Table 7 Vitamin D₂ content in a commercial multivitamin preparation containing excess amounts of vitamin E

Sample	Vitamin D ₂ content		
	Indicated	No. of assay	Found (M \pm SD)
No.6	400 IU/cap	5	422 \pm 15

2.1.3 比色法との比較検討結果

GLC法においては通常の混合ビタミン剤の場合(P 61)に従い操作しD₃を定量した。比色

法においては Mulder⁴⁾らに従い操作した。Table 8 に各々の結果を示した。両法による定量値はほぼ近似しており、このことは確立した G L C 法による定量法が混合ビタミン剤中の D の定量に十分利用できることを示している。

Table 8 Determination of vitamin D₂ in multivitamin powders and oily solutions by both GLC and colorimetric methods.

Sample	Indicated value of vitamin D ₂ (I.U./g)	Assayed value of vitamin D ₂	
		By GLC method (I.U./g)	By colorimetric method (I.U./g)
Sample no. 7	4,000	4,040	3,924
Sample no. 8	4,000	4,496	5,176
Sample no. 9	4,000	4,004	3,900
Sample no. 10	4,000	3,720	3,732
Sample no. 11	40,000	39,960	39,500
Sample no. 12	40,000	42,360	45,080
Sample no. 13	40,000	40,600	40,420
Sample no. 14	40,000	41,880	42,200

2. 1. 4 保存試験の結果

室温または虐待条件下で長期に保存されて多量の D₂, A 等の分解物を含む混合ビタミン剤の場合にも確立した G L C 法による定量法が適用できるかどうかにつき検討を行った。試料 No. 1, 2 及び 6 をそれぞれ購入時の容器に入れたまま密封し、暗所で室温または 40°C の恒温槽中に保存した。室温保存のものは約 12 ヶ月後にまた 40°C 保存のものは 1, 2, 3, 6, 9, 12 ヶ月後の適当な時期に試料の一部を取り出して D₂ を定量した。なお、試料 No. 1, 2 については参考までに第 8 改正日本薬局方の A 定量法の第 2 法に従い A の定量も行った。結果は Table 9 に示すとおりである。また保存開始時の定量値を 100 % とした時の D₂ の残存率は Fig. 10 に示すとおりである。試料 No. 1, 2 及び 6 の 40°C, 12 ヶ月保存後の残存率はそれぞれ 49.6, 44.7 及び 64.4 % であり、室温 12 ヶ月保存後のそれらは 72.6, 78.2 及び 78.5 % であった。各試料のガスクロマトグラムは Fig. 11 に示すように、試料が同一である限り保存条件または保存期間にかかわらず大差はなく、特に pyro-D₂ のピークを妨害するようなピークの出現はいずれの場合にも認められなかった。

Table.9

Assayed values of vitamin D₂ and A in commercial multivitamin preparations after storage at room temperature or 40°C

Condition of storage	Assayed value (IU/tab. or cap.)				
	Sample No. 1		Sample No. 2		Sample No. 6
	D ₂	A (f)	D ₂	A (f)	D ₂
initial	270	2,970 (0.97)	412	2,650 (0.94)	410
40°C, 1 month	242	2,940 (0.97)	348	2,590 (0.91)	—
“ , 2 “	224	2,850 (0.87)	260	2,190 (0.76)	—
“ , 3 “	210	2,650 (0.81)	240	1,960 (0.73)	388
“ , 6 “	208	— —	226	— —	—
“ , 9 “	—	— —	—	— —	290
“ , 12 “	134	2,030 (0.66)	184	1,820 (0.70)	264
RT*, 12 “	196	2,780 (0.83)	332	2,510 (0.79)	322

* RT=room temperature

Fig. 10 Residual rate of vitamin D₂ in commercial multivitamin preparations after storage at room temperature or 40°C

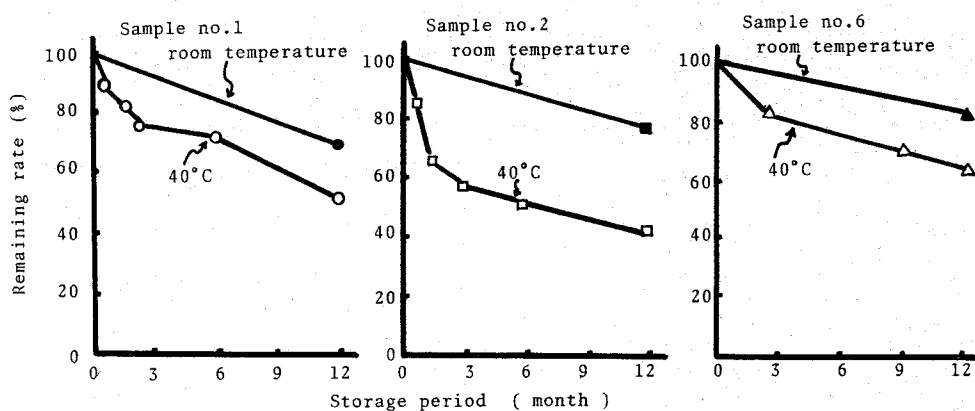
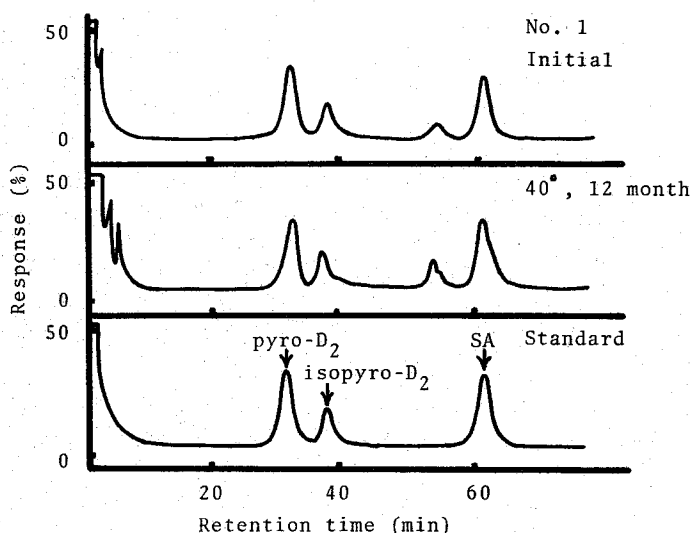


Fig. 11

Gas chromatograms of commercial multivitamin preparations



2.2 マグロ肝油並びにビタミンD₃樹脂油中のビタミンD₃の定量

天然物中におけるDの産出は非常に限定されている。その中で唯一の豊富な資源は魚の肝油である。Bell¹⁶⁾らはタラの肝油中のDの定量をGLC法により行っている。試料の不けん化物をメタノール冷却、ジギトニン沈殿法並びに2段階のカラムクロマトグラフィーで精製後、三塩化アンチモン試薬により iso-D に異性化し TMS 化の後 GLC を適用している。別に Hommes¹⁴⁾ らもジギトニン沈殿法、2段階のカラムクロマトグラフィー、TLCにより精製し、iso-D に異性化の後 GLC 法でタラの肝油中のDの定量を行っているが、両法共に非常に操作が煩雑である。D₃樹脂油は7-DHCのUV照射物より7-DHCの大部分をメタノールを加えて-20°Cに放置し、更にタチステロールを無水マレイン酸付加反応で除いたのち、濃縮したものをいい、市販油溶液はこれを植物油などで適当に濃度を希釈したものであり、医薬品や飼料の原料として使用されている。マグロ肝油では混合ビタミン剤の場合と異なり、定量に際しステロールによる妨害を受けたのでジギトニン・セライトカラムクロマトグラフィーでステロールの大部分を除去することにした。しかしながら、これだけの前処理操作では不十分で、未知物質が pyro-D₃ のピークを妨害し定量可能とはならなかった。そこで未知物質を除去するためにいろいろな前処理操作を試みたが、満足すべき結果が得られず、TMS 化することによりはじめて定量可能となった。一方 D₃ 樹脂油に対しては植物油中のステロールを除去するためにマグロ肝油の場合と同様にジギトニン・セライトカラ

μクロマトグラフィーを使用し、UV照射した試料なのでTMS化の操作を行うことにした。

2.2.1 D並びに内部標準物質のガスクロマトグラフィー

D₂、D₃及びそれらのTMS体とCholesteryl acetate (CA)、Stigmasteryl acetate (SA)のGLCの保持時間並びにCAに対する各々の相対保持時間を求めてTable 10¹⁷⁾に示した。混合ビタミン剤の場合では内部標準物質としてSAを用いてきたがTable 10からもわかるようにD₃系はD₂系よりも保持時間が短かく各々のTMS体はTMS化していないものより更に短い。このようにD₃のTMS体の場合操作時間を短縮する目的でSAより保持時間の短いCAを使用することにした。

Table 10 Retention times and relative retention times
of vitamin D and sterol acetate

Compound	Retention time (min)	Relative retention time
D ₂	44.6 / 54.1	0.75 / 0.91
D ₃	38.0 / 45.7	0.64 / 0.77
D ₂ TMS ether	26.0 / 40.4	0.44 / 0.68
D ₃ TMS ether	22.0 / 34.5	0.37 / 0.58
Cholesteryl acetate	59.4	1.00
Stigmasteryl acetate	90.1	1.52

Note : Vitamin D gives twin peaks due to pyro- and
isopyro-D

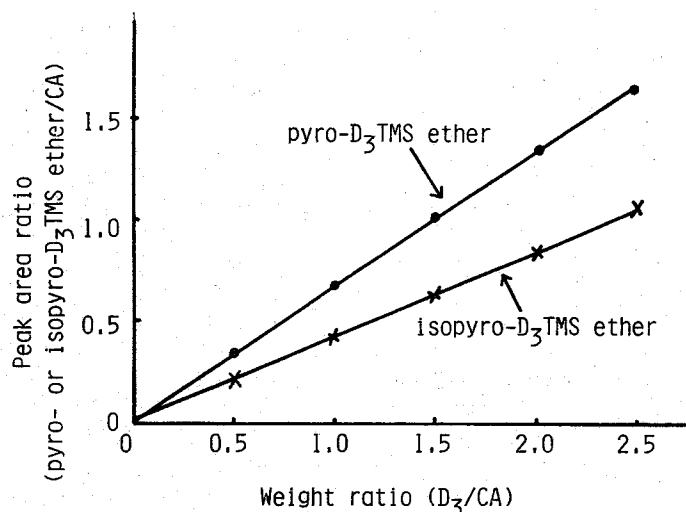
2.2.2 検量線

標準D₃、50, 100, 150, 200, 250 μg/mlとCA 100 μg/mlを含むベンゼン・ピリジン (95:5) 溶液の0.5 mlにつき第2章に関する実験の定量操作法の3)の④(P 64)に従ってTMS化後GLCに適用してFig.12に示す検量線が得られた。このようにTMS化した場合にも熱閉環をおこし、定量的にpyro-D₃ TMSとisopyro-D₃ TMSに変化することを利用する定量に際しては、大きなピークを与えるpyro-D₃ TMSを利用することにした。

2.2.3 マグロ肝油のガスクロマトグラフィーによるD₃の定量

Fig.13 はマグロ肝油を第2章に関する実験の定量操作法の3) (P 63)に従って操作したの

Fig. 12 Calibration curves of vitamin D₃ TMS ether by GLC



ち、GLCを行った時のガスクロマトグラムである。Fig.13 (I)は試料不けん化物をそのままGLCに適用した結果であり多量に共存するステロール類により pyro-D₃ 及び isopyro-D₃ のピークは妨害を受けて定量不可能であった。Fig.13 (II)は試料不けん化物を ジギトニン・セライトカラムクロマトグラフィー並びにTLCで処理した後、得られたガスクロマトグラムである。ステロール類は除去されたものの、Dと同一挙動をとる未知物質が pyro-D₃のピークを妨害し、定量不可能であった。Fig.13 (III)はFig.13 (II)に更にTMS化の操作を加えた時のガスクロマトグラムである。図からわかるように、未知物質と pyro-D₃ TMS体のピークは分離し、定量可能となった。以上の結果に基づいてマグロ肝油中のD₃を定量するためには試料不けん化物をジギトニン・セライトカラムクロマトグラフィーとTLCを行い、TMS化の後GLCに適用する方式を採用することにした。次に、マグロ肝油1gにつきD₃を16,000 IU添加し 第2章に関する実験の定量操作法の3) (P 63)に従って操作しD₃の添加回収実験を行った。Table 11に示すように回収率は99.5%と良好な結果が得られた。従って、前処理操作を行っていない検量線についての補正は行わずそのまま使用することにした。またD₃の定量値は10,800 ± 150 IU/g (M ± SD)で第8改正日本薬局方のA定量法第2法に従い定量したAの値は95,300 IU/gであった。これらの値を山川¹⁸⁾らが報告している値と比較するとDはその範囲内(10,000 ~ 45,000 IU/g)であり、Aはやや高めであった。

Fig. 13 Gas chromatograms of tuna liver oil

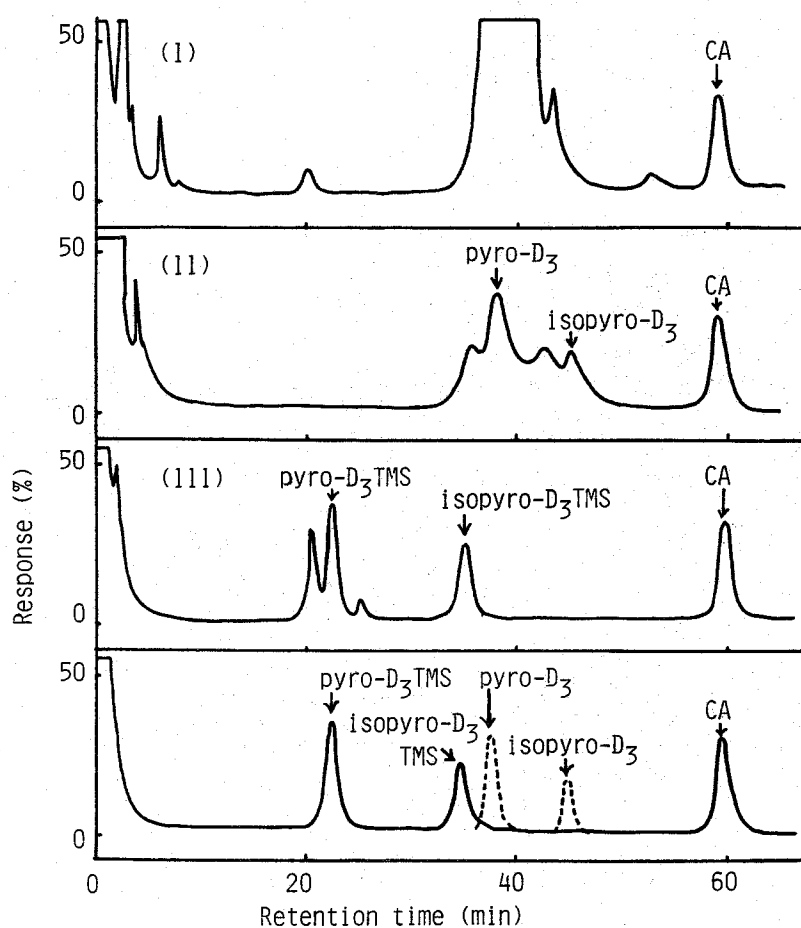


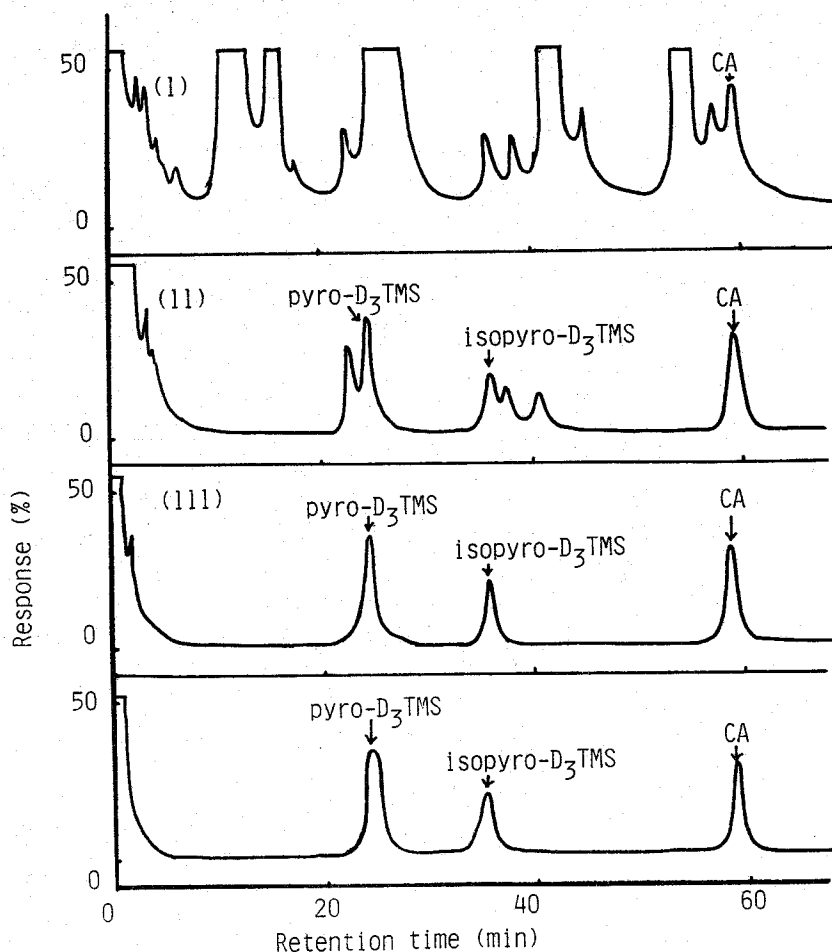
Table 11 Determination and recovery test of vitamin D₃ in a tuna liver oil.

Trial	Assayed value of vitamin D ₃ (I.U./g)			Recovery (%)
	Without addition of vitamin D ₃ (a)	16,000 I.U. of vitamin D ₃ added (b)	b-a	
1	10,720	26,320	15,600	97.5
2	10,920	26,640	15,720	98.3
3	10,960	27,000	16,040	100.3
4	10,600	26,920	16,320	102.0
Mean±S.D.	10,800±150			99.5±1.8

2.2.4 D₃樹脂油のガスクロマトグラフィーによるD₃の定量

Fig.14 はD₃樹脂油中のD₃の定量法を検討した結果である。Fig.14 (I)は試料不けん化物を直接TMS化したもののガスクロマトグラムであり、植物ステロールによるとと思われる多くの妨害がみられた。Fig.14 (II)は試料不けん化物をジギトニン・セライトカラムクロマトグラフィーを行ったのち、TMS化したもののガスクロマトグラムである。ジギトニン試薬でジギトナイドを形成しないルミステロールや残存するタチステロールに由来するピークがみられ、定量不可能であった。Fig.14 (III)は試料不けん化物をジギトニン・セライトカラムクロマトグラフィーとTLCを行いTMS化したもののガスクロマトグラムである。図からわかるように pyro-D₃ TMS体のピークを妨害していたものはTLCで除去され、定量可能となった。以上の結果に基づいて、D₃樹脂油中のD₃を定量するためには、マクロ肝油の場合と同様の操作法を採用することにした。次

Fig. 14 Gas chromatograms of vitaminD₃ resin oil



にD₃樹脂油 16 検体中のD₃を各々1回ずつ定量した。(Table 12)

Table 12 Determination of vitamin D₃ in vitamin D₃ resin oils.

Sample No.	Vitamin D ₃ (I.U./g)		Sample No.	Vitamin D ₃ (I.U./g)	
	Indicated value	Assayed value		Indicated value	Assayed value
1	100,000	89,300	9	10,000	10,200
2	100,000	91,400	10	10,000	7,960
3	100,000	110,300	11	10,000	8,000
4	100,000	78,800	12	10,000	7,960
5	100,000	92,200	13	10,000	8,440
6	100,000	79,600	14	10,000	8,160
7	100,000	75,000	15	10,000	7,360
8	100,000	83,700	16	10,000	9,480

2.3 照射乾燥酵母中のビタミンD₂の定量

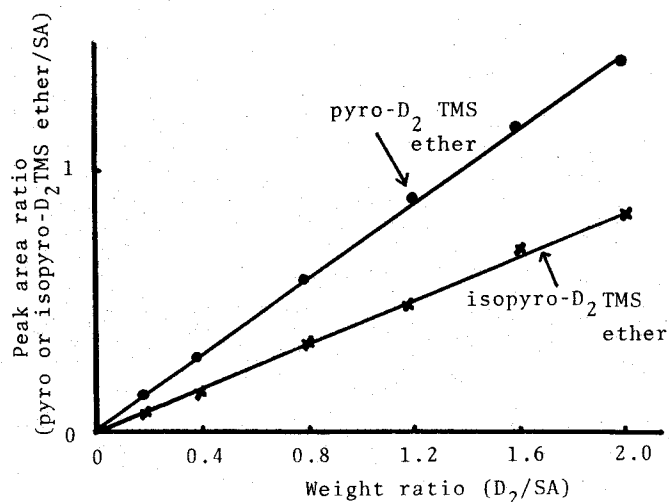
乾燥酵母は第9改正日本薬局方で*Saccharomyces*に属する酵母の菌体を乾燥して粉末としたものと記載され、常用量は1日5～10gとなっている。このものは栄養補給，食欲不振，消化不良，便秘に対する整腸剤に用いられる。UV照射した酵母中のD₂の定量に関してはBruchmann¹⁹⁾の比色法が報告されている。しかし，比色法であるため，妨害物の完全除去の必要性から非常に煩雑である。乾燥酵母にはErgosterolが豊富に存在することは古くからよく知られている。一方Dは含まれていないと報告され²⁰⁾，UV照射によって初めて生成する。よってDの定量はUV照射したものにつき行った。

2.3.1 検量線

標準D₂ 20, 40, 80, 120, 160, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とSA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むベンゼン・ピリジン(95:5)溶液の0.5 mlにつき第2章に関する実験の定量操作法の3)の④(P 64)に従ってTMS化の後GLCに適用してFig.15に示す検量線が得られた。D₂の場合と同様にTMS化した場合も熱閉環をおこしpyro-D₂TMSとisopyro-D₂TMSに定量的になる。定量に際しては大きなピークを示すpyro-D₂TMSを利用することにした。

2.3.2 照射乾燥酵母のガスクロマトグラフィーによるD₂の定量

Fig. 15

Calibration curves of D_2 TMS ether by GLC

乾燥酵母試料 α_1 を健康線ランプより10 cm離し(照射エネルギー:20E-Viton/ cm^2)1時間照射して得た照射乾燥酵母を試料とし、 D_2 の定量条件の検討を行った。Fig.16 (I)は試料不けん化物を直接TMS化したもののガスクロマトグラムであり、多量に共存するステロール類により pyro- D_2 及び isopyro- D_2 のTMS体のピークは妨害されて定量不可能であった。Fig.16 (II)は試料不けん化物をジギトニン・セライトカラムクロマトグラフィーを行ったのちTMS化したもののガスクロマトグラムである。ステロール類の多くは除去されたが、pyro- D_2 のTMS体に重なる妨害物のピークがあり定量不可能であった。Fig.16 (III)は試料不けん化物につきTLCを行ったのちTMS化したもののガスクロマトグラムである。図からわかるように pyro- D_2 のTMS体のピークを妨害するような化合物はTLCではほとんど除去され定量可能となった。以上の結果に基づいて照射乾燥酵母中の D_2 を定量するためには、試料不けん化物をTLC処理後、TMS化し、GLCを行う方式を採用することにした。次に前記で得られた照射乾燥酵母に標準 D_2 を800 IU/g添加し、 D_2 の回収率を求めたところTable 13に示すように、満足すべき結果が得られた。従って前処理操作による補正は必要でないと判断し、検量線をそのまま使用することにした。

2.3.3 照射紫外線量と D_2 の生成量との関係

乾燥酵母試料 α_2 に健康線ランプの光を20E-Viton/ cm^2 のエネルギーで 時間を変えて照射し 攪拌操作を行ったものを行わないものにつき第2章に関する実験の定量操作法の4)(P 64)に従

Fig.16 GLC behavior of irradiated dried yeast

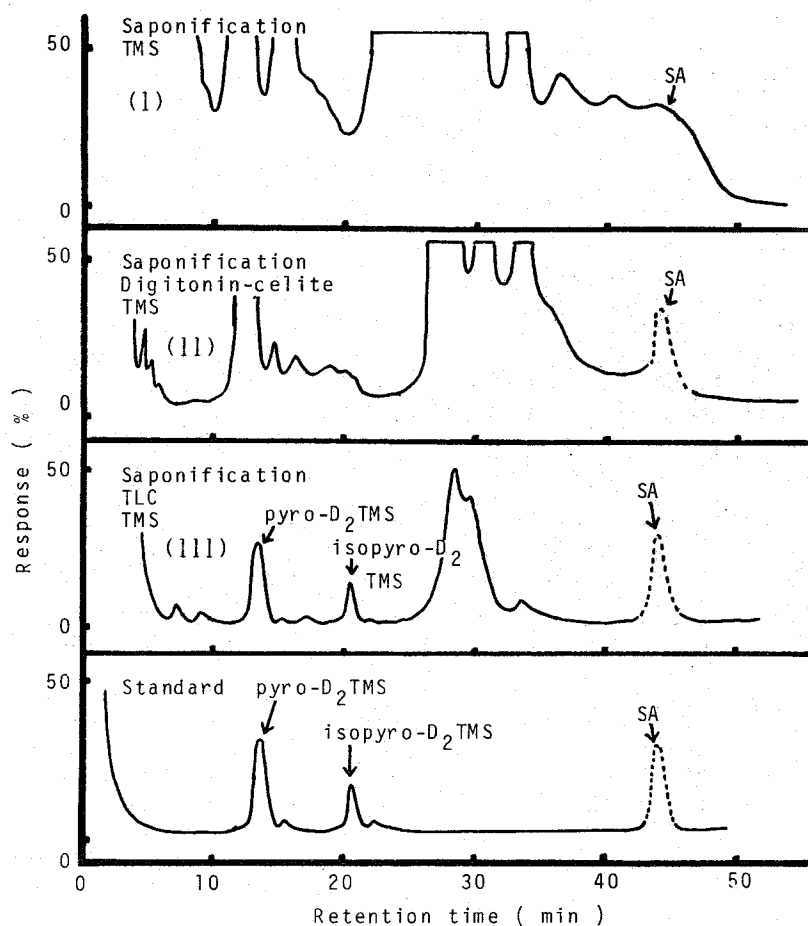


Table 13

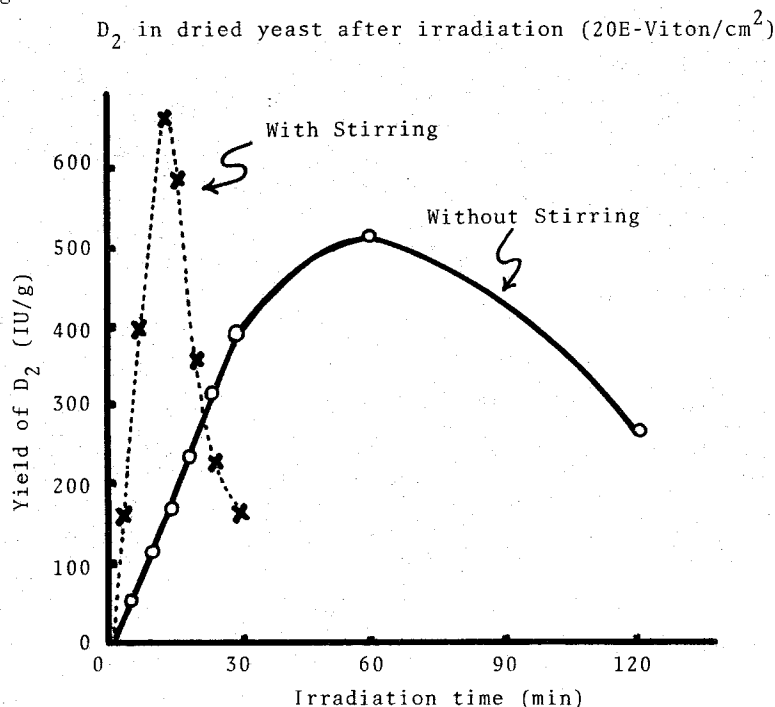
Determination and recovery test of vitamin D₂ in dried yeast

Trial	Assayed value of vitamin D ₂ (IU/g)				Recovery (%)
	Added value	With addition of vitamin D ₂ (A)	without addition of vitamin D ₂ (B)	A-B	
1	800	1,800	930	870	108.8
2	800	1,760	930	830	103.8
3	800	1,930	1,100	830	103.8
4	800	1,800	1,000	800	100.0
5	800	1,760	910	850	106.3
M±SD		970±69		104.5±3	

Note : The samples of dried yeast were irradiated for 1hr with a Erythemat ultraviolet lamp (20E-Viton/cm²)

い、 D_2 を定量しその生成量を調べた。その結果 Fig. 17 に示すように 攪拌操作を行った場合には生成量は 15 分で最大 (665 IU/g) に到達し、以後急激に減少した。一方攪拌操作を行わない場合には 1 時間で最大 (520 IU/g) となり、以後漸減した。なおいずれの場合も前者では 15 分まで、後者では 30 分までの照射において照射紫外線量と D_2 の生成量には比例関係が成立した。なお無照射時において D_2 は検出されなかった。

Fig. 17



2.4 照射シイタケ中のビタミン D_2 の定量

照射シイタケ中の D_2 の定量に関しては有本¹²⁾、藤田²²⁾らの比色法が報告されている。いずれの場合もその操作が煩雑である。シイタケ中にかなりの量の Ergosterol が含まれていることは古くから知られているが D_2 は殆んど含まれておらず²¹⁾、UV 照射によって初めて生成してくる。従って乾燥酵母の場合と同様に D_2 の定量は UV 照射したシイタケに適用した。

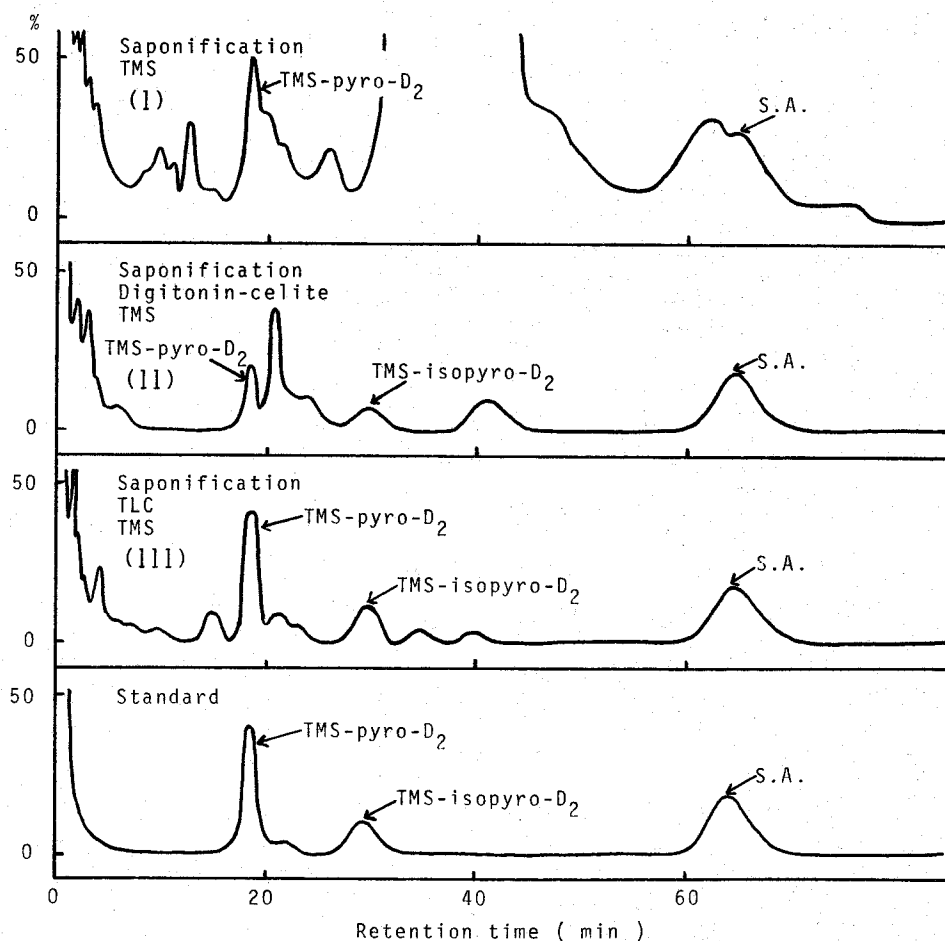
2.4.1 照射シイタケのガスクロマトグラフィーによる D_2 の定量

乾燥シイタケに健康線ランプの光を 20 E-Viton/cm² のエネルギーで菌褶部に 30 分間照射した後粉末状にしたものについて D_2 の定量条件の検討を行った。Fig. 18 (I) は試料不けん化物を直

接TMS化したもののガスクロマトグラムであり、多量に共存するステロール類により pyro-D₂ 及び isopyro-D₂ のTMS体のピークは妨害されて定量不可能であった。以降乾燥酵母の場合と同様に検討し、照射シイタケ中のD₂を定量するためには試料不けん化物をTLCに適用後TMS化し、GLCを行う方式を採用することにした。しかし乾燥シイタケを3E-Viton/cm²のエネルギーで、5～30分間程度健康線ランプの光を照射した時にはD₂の生成量が200～800IU/gと少ないのでGLCでの定量限界以上とするために試料の採取量を多くしたところ、共存するステロール類の絶対量が多くなり、アセトン、その他の有機溶媒に完全に溶解せず、結晶が析出して操作が不可能となったので、やむをえずジグトニン・セライトカラムクロマトグラフィーを行ってステロール類の大部分を除去したのちTLCを適用し、TMS化の後GLCを行うことにした。次

Fig. 18

Gas chromatograms of irradiated dried "Shiitake"



に 20 E-Viton/cm² のエネルギーで 30 分間照射して得た乾燥シイタケに標準 D₂ を 1,600 IU/g 添加して D₂ の回収率を求めたところ Table 14 に示すようにほぼ 100 % に近い満足すべき結果が得られた。

Table 14 Determination and recovery test of vitamin D₂ in dried Shiitake

Trial	Estimated value of vitamin D ₂ (IU/g)				Recovery (%)
	Added value	With addition of vitamin D ₂ (A)	Without addition of vitamin D ₂ (B)	A-B	
1	1,600	2,540	870	1,670	104.4
2	1,600	2,800	1,110	1,690	105.6
3	1,600	2,730	1,060	1,670	104.4
4	1,600	2,710	1,070	1,640	102.5
5	1,600	2,540	980	1,560	97.5
M±SD		1,020±85			102.9±2.8

Note : The sample of dried Shiitake were irradiated for 30 min with a Erythemat ultraviolet lamp (20E-Viton/cm²).

2.4.2 照射紫外線量と D₂ の生成量との関係

乾燥シイタケを 20 E-Viton/cm² のエネルギーで時間を変えて UV 照射したのち第 2 章に関する実験の定量操作法の 5) (P 64) に従って D₂ を定量し、D₂ 生成量を調べた。Fig.19 に示すように照射時間の増加と共に D₂ の生成量は増加して 5 時間で最大となり、更に照射を続けたところ、D₂ 生成量は漸次減少していった。次に乾燥シイタケの 1 日の食用量 (約 2 個) から D₂ の所要量 (400 IU/日) を充足するためにはどの程度の照射を行えばよいかを知る目的で、同じロットの乾燥シイタケを 3 E-Viton/cm² のエネルギーの紫外線で 5~30 分間照射したのち第 2 章に関する実験の定量操作法の 5) (P 64) に従って D₂ を定量した。Fig.20 に示すように、この実験条件下では照射紫外線と D₂ の生成量との間にはほぼ直線関係が成立した。1 分間の照射に対する D₂ 生成量は 29 IU/g であった。D₂ の所要量、シイタケの 1 日常用食用量 (約 2 個) などを見ると、この条件下では 10~15 分間の照射を必要とした。

2.4.3 シイタケ中の D₂ 含量

和歌山、大分、愛媛、岩手、群馬各県産の乾燥シイタケを無照射時並びに 3 E-Viton/cm² で 15 分間、20 E-Viton/cm² で 5 時間 UV 照射したものにつき D₂ を定量したところ Table 15 に示す結果を得た。かなりの個体差が認められた。無照射時においてはいずれも D₂ は含まれていなかった。

Fig. 19

Estimated values of vitamin D₂ in dried "Shiitake" after various times of irradiation with a Erythemat ultraviolet lamp.

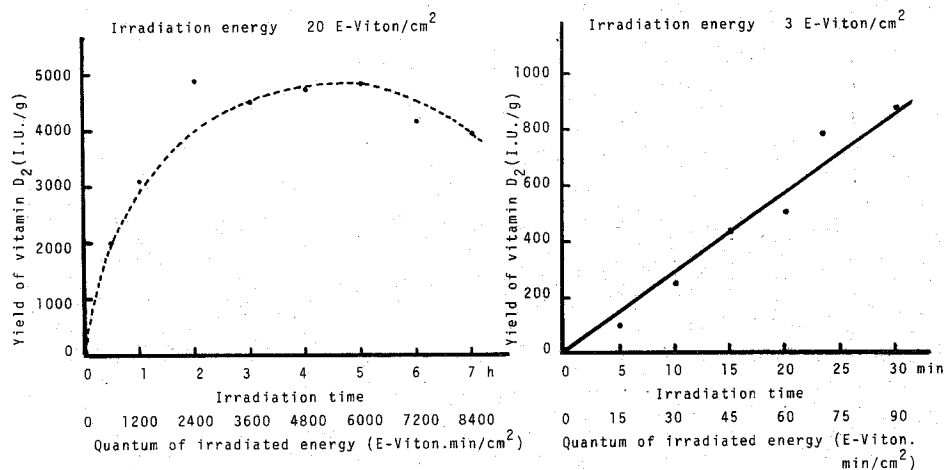


Table 15 Assayed value of

vitamin D₂ in dried Shiitake produced
at different places after irradiation
with a Erythemat ultraviolet lamp

Place	Assayed value		
	Vitamin D ₂ (I.U./g)		
	Without irradiation	3E-Viton/cm ² 15min	20E-Viton/cm ² 5h
Wakayama	0	430	4,800
Ōita	0	610	5,720
Ehime	0	410	6,940
Iwate	0	290	3,480
Gunma	0	290	1,610

2.5 小 括

GLCを用いてDの定量につき検討し、次のような結論を得た。

1. GLCを用いて混合ビタミン剤等のDの定量法を確立した。試料によって多少の違いはあるが所要時間は3～4時間の範囲にあり、これまでの動物試験法、比色法にくらべかなり簡便と

なった。

2. 動物試験法並びに比色法では分離不可能であった D_2 並びに D_3 をGLCを用いることにより、分離可能とし、試料中の D_2 並びに D_3 の存在状態を明らかにした。
3. D, A等の分解物を多く含む試料でも適用可能であったので、製剤中のDの安定性試験にも利用出来ることを明らかにした。
4. 著者の検討した範囲での乾燥酵母並びにシイタケ中にはDは含有されていなかった。

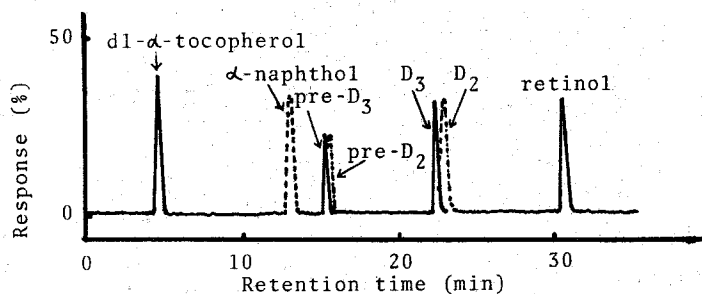
第3章 高速液体クロマトグラフィーによる ビタミンDの定量

3.1 市販混合ビタミン剤中のビタミンD₂の定量

Tomkins⁹⁾らはゼラチンで被われたA acetateとD₂顆粒中のD₂をdimethyl sulfoxideを加えてゼラチン膜を破った後直接HPLCに適用している。またHofsass¹¹⁾らはAを含む濃縮物中のD₃をけん化の後、その不けん化物を直接HPLCに適用している。GLCの場合と同様にHPLCにおいてもFig. 21に示すようにpre-D₂も、A、Eと分離するので比色法のような完全な妨害物の除去操作を行う必要はない。著者はこれまでGLC法で得た経験を基にHPLC法により混合ビタミン剤中のDの定量法を検討した。なおHPLCではGLCの場合とは異り、Fig. 21

Fig. 21

HPLC of D₂, D₃, pre-D₂, pre-D₃, A and E



に示すようにD₂とpre-D₂は分離するので、D₂とpre-D₂を合計してD₂含量としなければならない。

3.1.1 通常の混合ビタミン剤

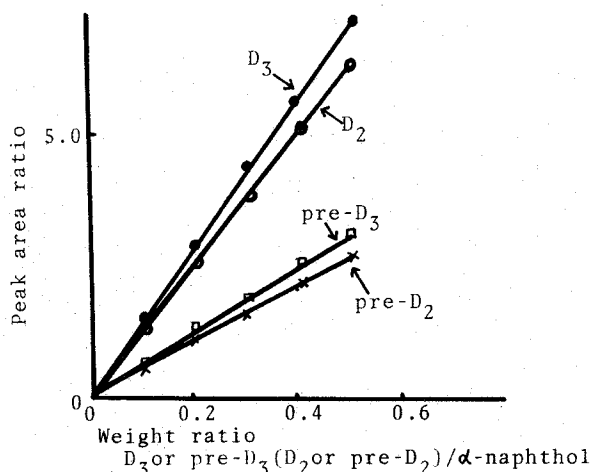
定量操作法の概略はけん化及び不けん化物の分離→TLC→HPLCである。

3.1.1.1 検量線

標準D₂またはpre-D₂ 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と α -ナフトール 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むn-ペンタン溶液を第3章に関する実験の定量操作法1)の③(P 66)に設定した条件でHPLCに適用して検量線を作成した。(Fig. 22) この図において、同じ含量の時のD₂とpre-D₂の内部標準物質

に対するピーク面積比の比を計算していったところ、pre-D₂はD₂に対して0.45であった。

Fig. 22 Calibration curves of D₂ or D₃ by HPLC



そこでpre-D₂の標準溶液を毎回調製することは非常に手間がかかるので、試料中のpre-D₂含量はpre-D₂のピーク面積を、標準D₂のそれと比較して得られた値に換算係数0.45を乗じて求めることにした。D₃系についても同様である。なおpre-D₂はD₂ 50 mgを二塩化エチレン50 ml中で30分間還流させた後、TLCで精製し得た。

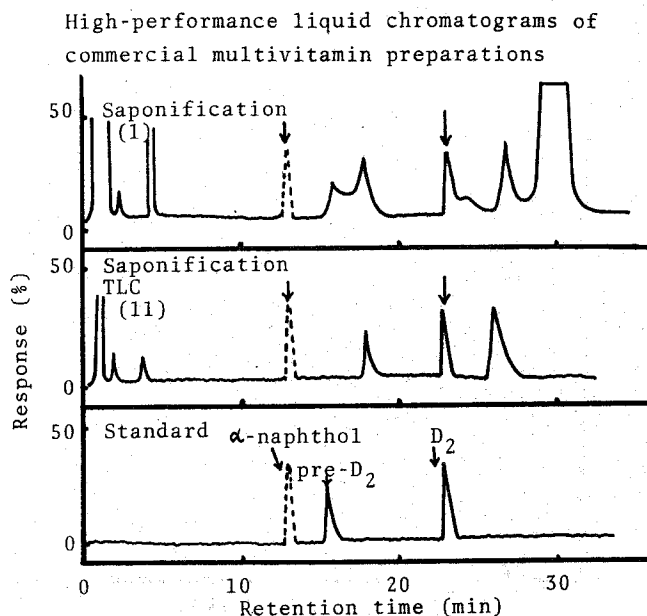
3.1.1.2 市販混合ビタミン剤の高速液体クロマトグラフィーによるD₂の定量

Fig. 23 (I)は市販混合ビタミン剤試料No.7を試料として、その不けん化物を直接HPLCに適用したもの的高速液体クロマトグラムである。D₂のピークはわずかながらEの分解物により妨害を受け、定量不可能であった。これに対しFig. 23 (II)はGLCの前処理の場合と同様に、試料不けん化物をTLCに適用して妨害物を除去した後HPLCに適用した結果であり、TLCの適用によって定量可能となった。従ってHPLC法の場合にもGLC法と同様の前処理操作を適用することにした。次に市販混合ビタミン剤(試料No.2及びNo.7)を購入直後に、D₂を定量したところ、バラツキは少なく良好な結果が得られた。(Table 16)

3.1.1.3 GLC法との比較

市販混合ビタミン剤試料No.7につき、確立したGLC法並びにHPLC法で各々30回ずつD₂の定量を行い、両者の間の相関関係を調べた。(Fig. 24) 相関係数は0.958であり、両法による結果の間には高度の相関関係があることがわかった。

Fig. 23

Table 16 Vitamin D₂ content in commercial multivitamin preparations

Sample	Vitamin D ₂ content		
	Indicated	No. of assay	Found (M \pm SD)
No. 2	400 IU/cap.	5	406 \pm 4
No. 7	200 IU/tab.	5	201 \pm 10

3.1.2 ビタミンEを多量に含む混合ビタミン剤

定量操作法の概略はけん化及び不けん化物の分離→PTAカラムクロマトグラフィー→TLC→HPLCである。

3.1.2.1 市販混合ビタミン剤の高速液体クロマトグラフィーによるD₂の定量

Fig. 25 (I)は市販混合ビタミン剤(試料No. 6, 室温, 3年保存。)の不けん化物をTLCに適用後HPLCを行ったものの高速液体クロマトグラムである。TLCのみの前処理操作だけでは, 妨害物による影響を受けるので, GLCの場合と同様さらにPTAカラムクロマトグラフィーによる

Fig. 24

Correlation between D_2 values by GLC and HPLC methods (commercial multivitamin preparation)

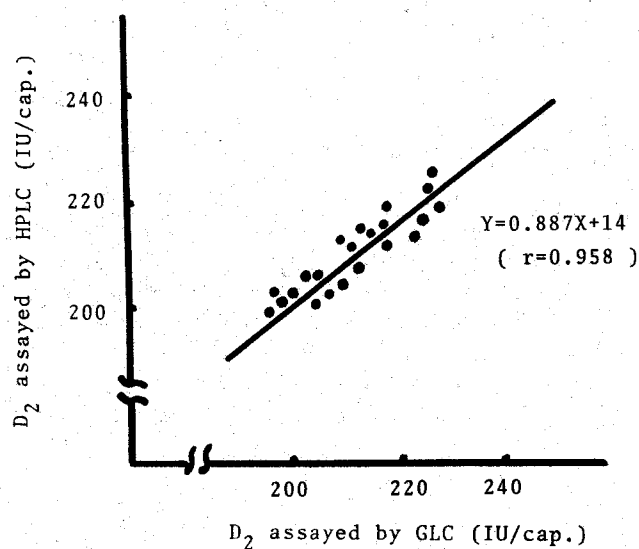
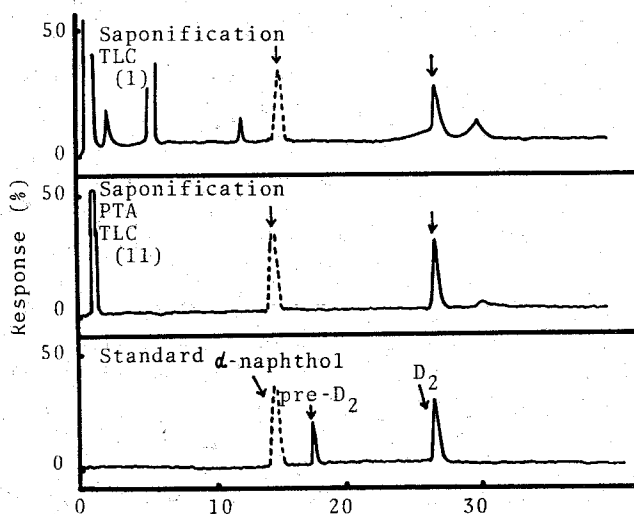


Fig.25

High-performance liquid chromatograms of commercial multivitamin preparations



処理をつけ加えたところ、Fig.25(II)に示すように 妨害物は除去され定量可能となった。この方

法に従い、繰り返しD₂の定量を行ったところ満足すべき結果を得た。(Table 17)

Table 17 Vitamin D₂ content in commercial multivitamin preparations

Sample	Vitamin D ₂ content	
	Indicated No. of assay	Found (M±SD)
No. 6	400 IU/cap. 5	238 ± 11

3.1.2.2 GLC法との比較

市販混合ビタミン剤(試料No. 6, 室温, 3年保存)につき, 確立したGLC法並びにHPLC法で各々5回ずつ繰り返し定量を行った。(Table 18)両法による定量値はほぼ近似していた。なお保存開始時の定量値を100%とした時, 室温で3年間保存後のD₂の残存率は54.9%であった。

Table 18 Determination of vitamin D₂ in commercial multivitamin preparations by both GLC and HPLC methods

Sample	No. of assay	Assayed value of vitamin D ₂ (IU/cap.)	
		By GLC method (M±SD)	by HPLC method (M±SD)
(Indicated value of vitamin D ₂)			
(No. 6)	5	225 ± 15	238 ± 11
(400 IU/cap.)			

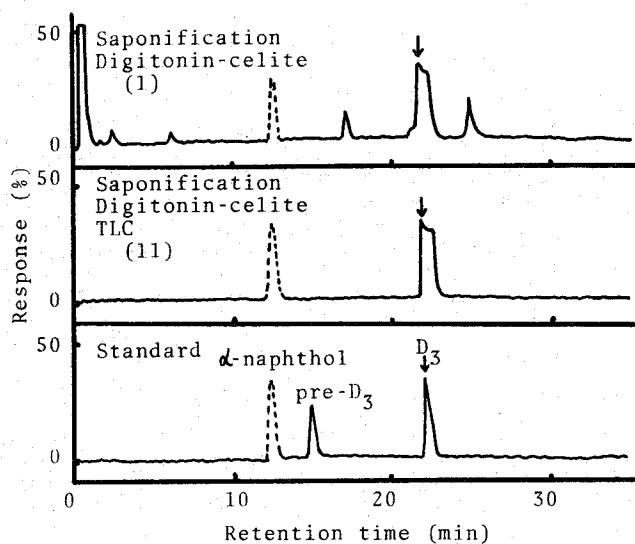
3.2 マグロ肝油並びにビタミンD₃樹脂油中のビタミンD₃の定量

水産物中のDの定量に関しては, 比色法並びにGLC法による報告は見られるが, HPLCを用いた報告はいまだ見られない。一方HPLCを用いたD₃樹脂油中のDの定量に関しては, Hofsass¹¹⁾らまたTartivita⁸⁾らの報告があり, 共に試料を直接HPLCに適用している。著者もGLC法により検討した結果に基づいてHPLCを用いて検討を行った。

3.2.1 マグロ肝油の高速液体クロマトグラフィーによるD₃の定量

Fig. 26 (I)はマグロ肝油の不けん化物をジグトニン・セライトカラムクロマトグラフィーに適用後HPLCを行った時の高速液体クロマトグラムである。共存する妨害物により D_3 のピークは影

Fig. 26 High-performance liquid chromatograms of tuna liver oils

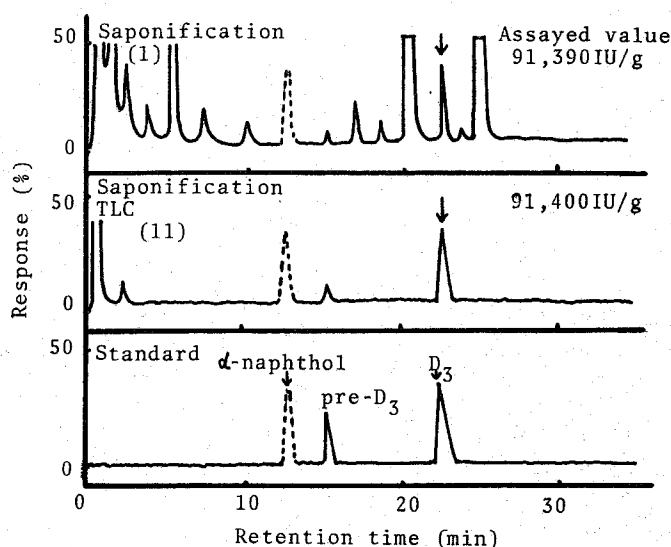


響を受け、定量不可能であった。Fig. 26 (II)は 試料不けん化物をジグトニン・セライトカラムクロマトグラフィー並びにTLCを行ったものの高速液体クロマトグラムである。GLCの場合と同様に未知物質が D_3 のピークを妨害し、定量不可能であった。GLC法ではTMS化の操作を加えることにより、はじめて未知物質と $\text{pyro-}D_3$ TMSのピークとが分離し定量可能となったが、HPLC法の場合にはTMS化を行うとGLCの場合とは異って極端に保持時間が早くなるため、溶出液から検討しなおさなければならない。従って統一した定量条件をとるためにHPLCではTMS化を行わない方針をとってきた。幸にしてマグロ肝油中の D_3 に関してはGLC法で定量可能となるので、GLC法でのみ定量を行うことにした。

3.2.2 D_3 樹脂油の高速液体クロマトグラフィーによる D_3 の定量

Fig. 27 (I)は D_3 樹脂油、試料No. 1の不けん化物を直接HPLCに適用したものの高速液体クロマトグラムであり、Fig. 27 (II)は試料不けん化物をTLCに適用し D_3 並びに $\text{pre-}D_3$ 画分をかきとり、HPLCに適用したものの高速液体クロマトグラムである。両者の定量値はほぼ等しかった。この結果を基に D_3 の定量の際には試料不けん化物を直接HPLCに適用することにした。

Fig. 27 High-performance liquid chromatograms of vitamin D₃ resin oils



次にD₃樹脂油試料№.1～5中のD₃を定量した。(Table 19)

3.2.3 GLC法との比較

D₃樹脂油試料№.1～5につき、確立したGLC法並びにHPLC法で各々1回ずつD₃の定量を行った。(Table 20) 両法による定量値はほぼ近似していた。

Table 19 Determination of vitamin D₃ in vitamin D₃ resin oils

Sample №.	Vitamin D ₃ (IU/g)	
	Indicated value	Assayed value
1	100,000	90,400
2	100,000	95,700
3	100,000	112,800
4	100,000	77,900
5	100,000	95,000

Table 20 Determination of vitamin D₃ in vitamin D₃ resin oils by GLC and HPLC methods

Sample №.	Indicated value of vitamin D ₃ (IU/g)	Assayed value of vitamin D ₃ (IU/g)	
		By GLC method	By HPLC method
1	100,000	89,300	90,400
2	100,000	91,400	95,700
3	100,000	109,300	112,800
4	100,000	78,800	77,900
5	100,000	92,200	95,000

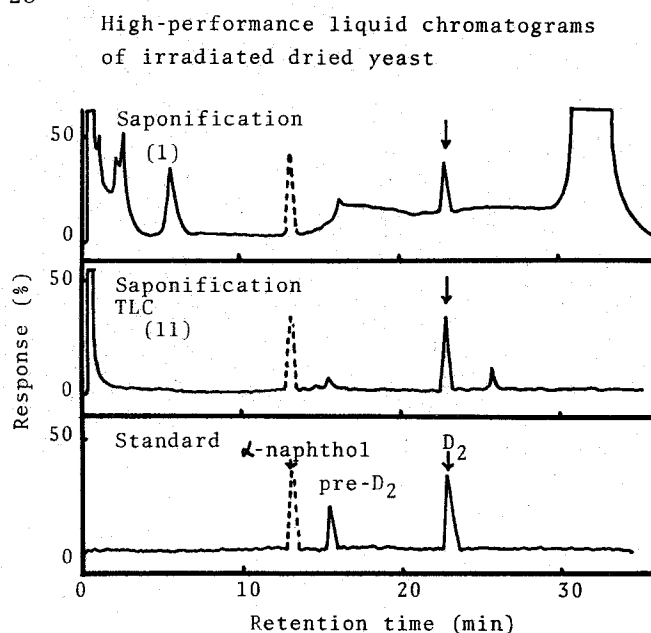
3.3 照射乾燥酵母中のビタミンD₂の定量

前章においてGLC法により照射乾燥酵母中のD₂の定量法を確立したことを述べた。そこでHPLCについても検討を行った。

3.3.1 照射乾燥酵母の高速液体クロマトグラフィーによるD₂の定量

Fig.28(I)はNo.5に20 E-Viton/cm²のエネルギーで1時間UV照射した後、けん化しその不けん化物を直接HPLCに適用した時の高速液体クロマトグラムである。D₂のピークは妨害物

Fig. 28



の影響を受け定量不可能であった。そこでTLCの操作を加えるとFig.28(II)に示すように、定量可能となった。前記のUV照射乾燥酵母中のD₂を繰り返し第3章に関する実験の定量操作法の4) (P 67)に従い定量したところ、バラツキは小さく良好な結果が得られた。(Table 21)

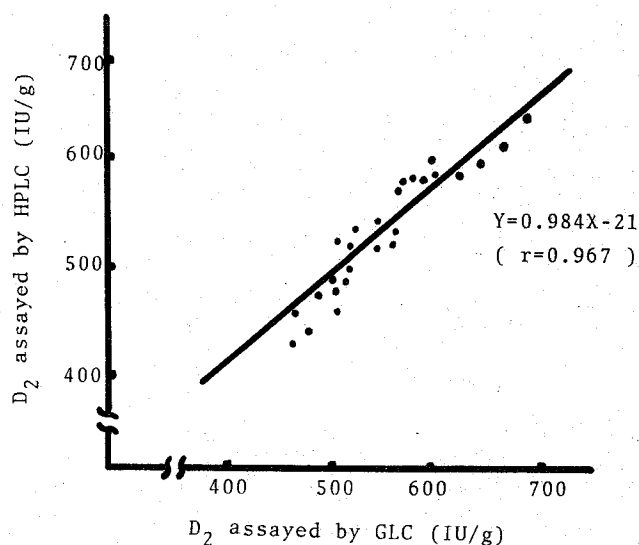
Table 21 Determination of vitamin D₂ in irradiated dried yeast

Sample	No. of assay	Vitamin D ₂ (IU/g) Assayed value (M±SD)
No. 5	5	620 ± 22

3.3.2. GLC法との比較

乾燥酵母試料46.5に20E-Viton/cm²のエネルギーで1時間照射したものにつき、確立したGLC法並びにHPLC法で各々30回ずつD₂の定量を行い、両者の間の相関性を調べた。相関係数は0.967であり、両法による結果の間には高度の相関関係があるとの結果を得た。(Fig. 29)

Fig. 29 Correlation between D₂ values by GLC and HPLC methods (dried yeast)



3.4 照射シイタケ中のビタミンD₂の定量

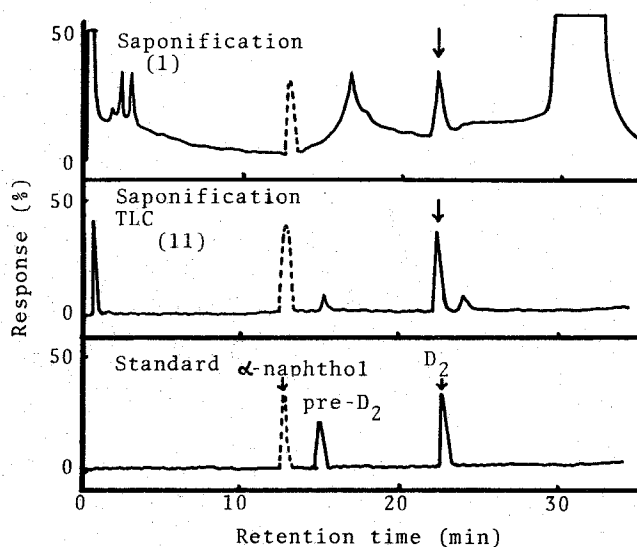
照射シイタケ中のDの定量に関しては比色法による報告は見られるがHPLCを用いたものはいまだ見られない。乾燥酵母の場合と同様にHPLCを用いて照射シイタケ中のD₂の定量法について検討を行った。

3.4.1 照射シイタケの高速液体クロマトグラフィーによるD₂の定量

Fig. 30(I)はシイタケに20E-Viton/cm²のエネルギーで30分間照射して得たUV照射シイタケの不けん化物を直接HPLCに適用したものの高速液体クロマトグラムである。D₂のピークは妨害物による影響を受け定量不可能であった。そこでTLCの操作を加えると、Fig. 30(II)に示すように妨害物はほとんど除去され定量可能となった。前記のUV照射シイタケ中のD₂を第3章に関する実験の定量操作法の5)(P68)に従い繰り返し定量したところ、バラツキは小さく良好な結果が得られた。(Table 22)

Fig. 30

High-performance liquid chromatograms
of irradiated dried shiitake

Table 22 Determination of vitamin D₂ in irradiated shiitake

No. of assay	Vitamin D ₂ (IU/g)
	Assayed value (M±SD)
5	1,160 ± 100

3.4.2 GLC法との比較

前記のUV照射シイタケ中のD₂をGLC法でも定量した。両法による定量値はほぼ近似していた。(Table 23)

Table 23 Determination of vitamin D₂ in irradiated dried shiitake by GLC and HPLC methods

No. of assay	Assayed value of vitamin D ₂ (IU/g)	
	By GLC method (M±SD)	By HPLC method (M±SD)
5	1,140 ± 46	1,160 ± 100

3.5 牛乳並びに母乳中のビタミンDの定量

牛乳並びに母乳中のDを定量することは栄養学的な観点から非常に重要なことであることは言うまでもない。牛乳並びに母乳中のDの定量に佐橋²³⁾ら(牛乳並びに母乳), Eisses²⁴⁾ら(濃縮牛乳), Panalaks²⁵⁾は(強化した牛乳)比色法を用いている。比色法の場合, 他の試料の場合と同様その操作が非常に煩雑である。著者は最初これまでの試料に適用してきた前処理方法を用いてGLC法で定量することを試みたが, 牛乳並びに母乳では, D含量が非常に小さく定量不可能であった。そこでDに関してより感度のよいHPLC法で定量した。

Thompson¹²⁾らは強化した牛乳を1晩室温で放置しけん化を行い試料不けん化物をHydroxylalkoxypropyl (HAP) Sephadex カラムクロマトグラフィーで精製後HPLCに適用している。著者もHAP Sephadex カラムクロマトグラフィーの前処理操作としての有効性を検討したが, ジギトニン・セライトカラムクロマトグラフィーとの併用によりはじめて適用可能となった。HAP Sephadex カラムクロマトグラフィーでは再使用の場合, 十分エー징ングする必要があり, かなりの時間を要する。そこで著者はこれまでの試料において用いてきた前処理方法を用いて, HPLC法で牛乳並びに母乳中のDの定量を行った。

3.5.1 牛乳中のD₃の定量

牛乳試料No. 2の500 mlにD₃を40 IU添加してD₃の回収率を第3章に関する実験の定量操作法6)(P 68)に従って操作し求めた。回収率101.9%と良好な結果が得られた。(Table 24)次に牛乳を市場より購入し, Dを定量した。Fig. 31 に定量した時の高速液体クロマトグラムを

Table 24 Determination and recovery test of vitamin D₃ in cow's milk

Trial	Assayed value of vitamin D ₃ (IU/ℓ)			Recovery (%)	
	Added value	with addition of	without addition		
		vitamin D ₃ (A)	of vitamin D ₃ (B)	A-B	
1	80	129	50	79	98.8
2	80	131	49	82	102.5
3	80	128	42	86	107.5
4	80	123	44	79	98.8
M ± S D			46 ± 3.4		101.9 ± 3.6

示す。DはCochromatographyの結果D₃と一致した。これは後で述べるGC-MS分析の結果

からも確認出来た。定量値をTable 25 に示した。比重は牛乳用比重計を用いて測定し、また脂

Fig. 31 High-performance liquid chromatograms of cow's milk

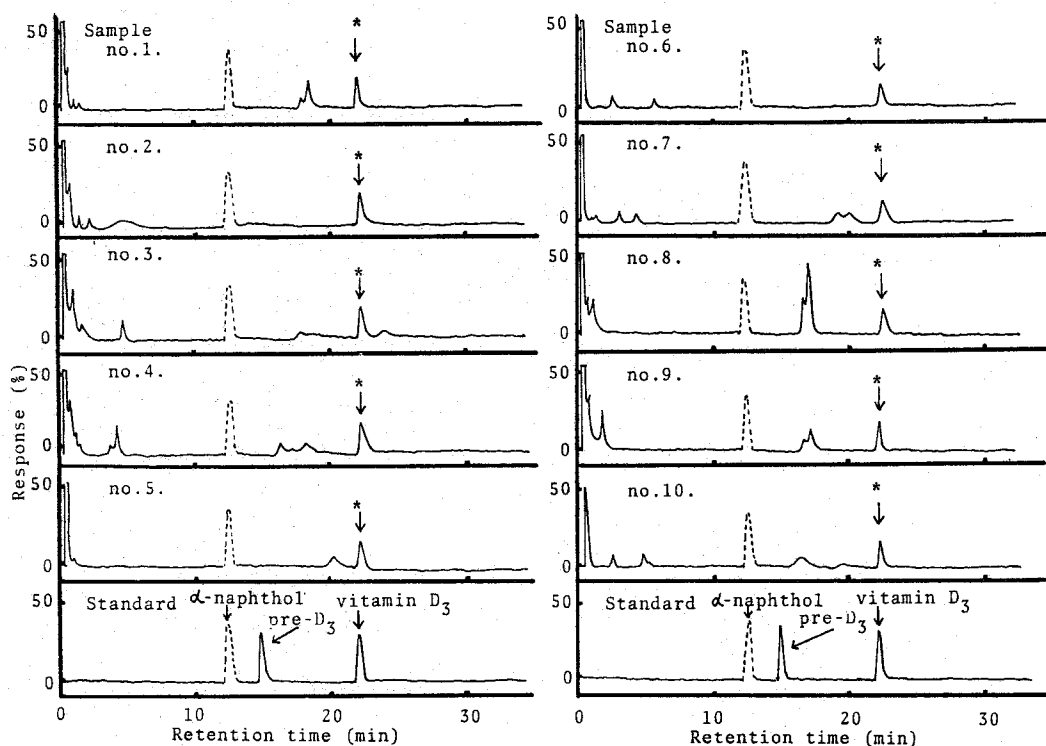


Table 25 Determination of vitamin D₃ in commercial cow's milk

Sample	SG*	milkfat(%)	Assayed value of D ₃ (IU/ℓ)	Sample	SG*	milkfat(%)	Assayed value of D ₃ (IU/ℓ)
No. 1	1.028	3.0	19	No. 6	1.029	4.0	79
No. 2	1.031	3.0	46	No. 7	1.031	3.3	48
No. 3	1.030	3.0	66	No. 8	1.030	3.0	39
No. 4	1.029	3.0	57	No. 9	1.031	3.3	23
No. 5	1.030	3.5	63	No. 10	1.032	3.1	24

* SG..... Specific Gravity

肪はバブコックの方法²⁶⁾に従い定量した。比重はすべて規格にあてはまり、脂肪も表示量以下のものは見当らなかった。D₃の定量値は19~79 IU/ℓの範囲にあり、メーカーの種類によって多少の変動がみられた。

3.5.2 母乳中のDの定量

母乳試料No. 11~13につき第3章に関する実験の定量操作法の6) (P 68) に従ってDを定量した。Fig.32に定量した時の高速液体クロマトグラムを示す。Dのピークは妨害物による影響を受けず定量可能であった。Table 26にDの定量値を示した。傾向としては牛乳の場合よりもやや高めであった。

Fig. 32 High-performance liquid chromatograms of human milk

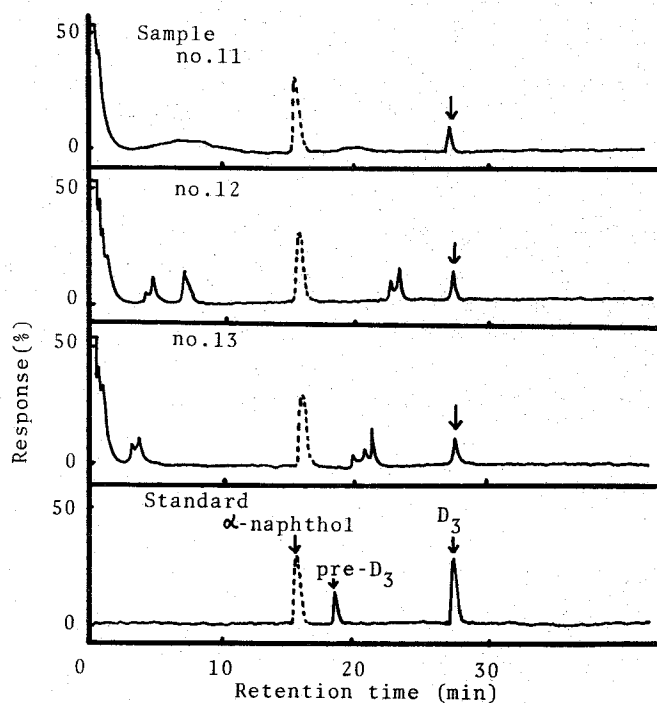


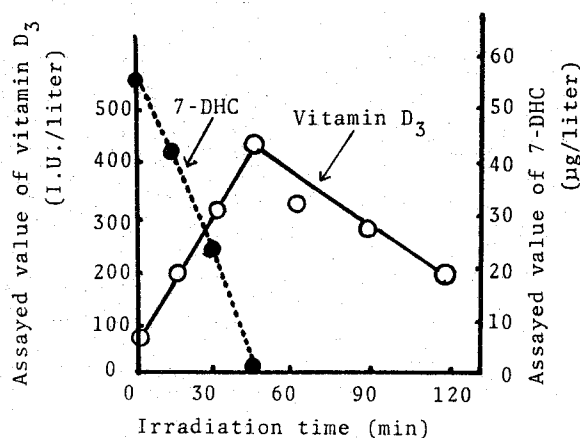
Table 26 Determination of vitamin D in human milk

Sample	Assayed value of vitamin D (IU/ℓ)
No. 11	64
No. 12	162
No. 13	65

3.5.3 UV照射によるD₃生成量の検討

市販牛乳試料No. 3に高圧水銀灯の光(120 V, 1.3 A)を照射し、経時的にD₃の生成量をHPLC法で調べた。Fig. 33に示すように45分の照射で最高値(432 IU/ℓ)を示し以後漸時減少していった。

Fig. 33 Yield vitamin D₃ in commercial cow's milk after UV irradiation



3.5.4 GC-MS分析による牛乳中のD₃の確認

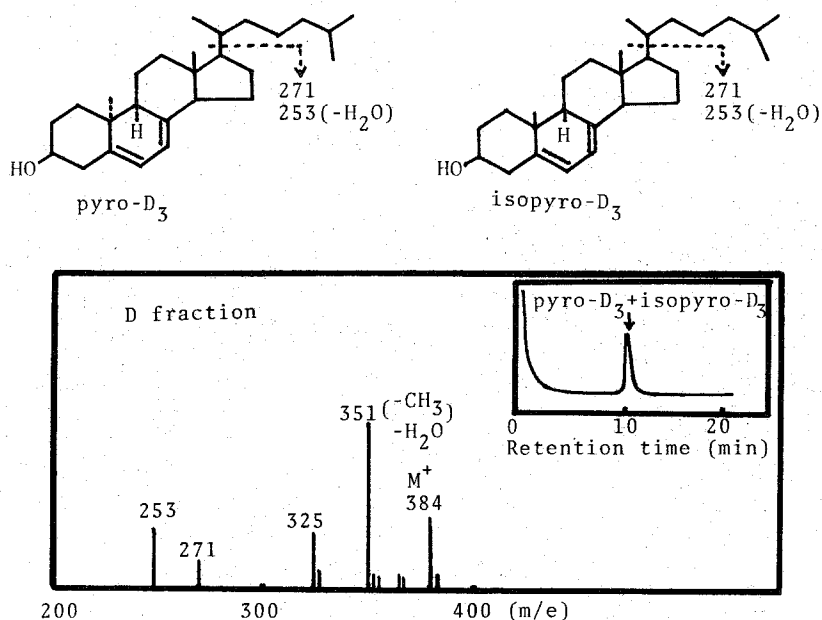
市販牛乳試料No. 3の25 ℓから不けん化物を抽出分離し、続いてメタノール冷却、ジギトニン沈殿法によりステロール類を沈殿させ沈殿物を除いて残った溶液についてTLCで精製後D画分を得た。GC-MS分析の結果をFig. 34に示す。D画分についてはm/e 384の分子イオンピークをはじめ側鎖のとれたm/e 271, 更に水のとれたm/e 253のピーク等を標準品のものとその相対強度を比較することによりD₃であることを確認した。牛乳中のDとしてD₂並びにD₃²⁷⁾が、更にD₄, D₅²⁸⁾が存在することが報告されているが、GC-MS分析の結果からはD₃以外は検出されなかった。

3.5.5 D硫酸エステルについての検討

佐橋²³⁾らは牛乳中に204 IU/ℓ, 母乳中に950 IU/ℓのD硫酸エステルを定量している。またLakdawala²⁹⁾らも佐橋らの方法に従い牛乳中に60 IU/ℓ, 母乳中に712~360 IU/ℓのD硫酸エステルの存在を報告している。一方Le Boulch³⁰⁾らは別の方法で牛乳中に176 IU/ℓ, 母乳中に400 IU/ℓと報告している。そこで著者も佐橋らの方法²³⁾に従い操作し、牛乳3試料

Fig. 34

GC-MS of D fraction in cow's milk



(試料№.2, 3 及び 4) 並びに母乳 1 試料 (試料№.11) につき定量を行った。Fig. 35 は試料№.2 並びに №.11 の母乳を検討した時の高速液体クロマトグラムである。この図に示すように D に対応するところにはピークは検出されず、D に特異な呈色試験である Nield 試薬によっても検出されなかった。D 硫酸エステルの場合 D を多量に負荷したウサギの尿から D 硫酸エステルが検出されていること。³¹⁾ 尿中にステロイドの硫酸エステルが検出されていること³²⁾³³⁾ 等から考えあわせて、D 硫酸エステルは D を多量摂取した際に現われる排泄型ではないかと考えられる。

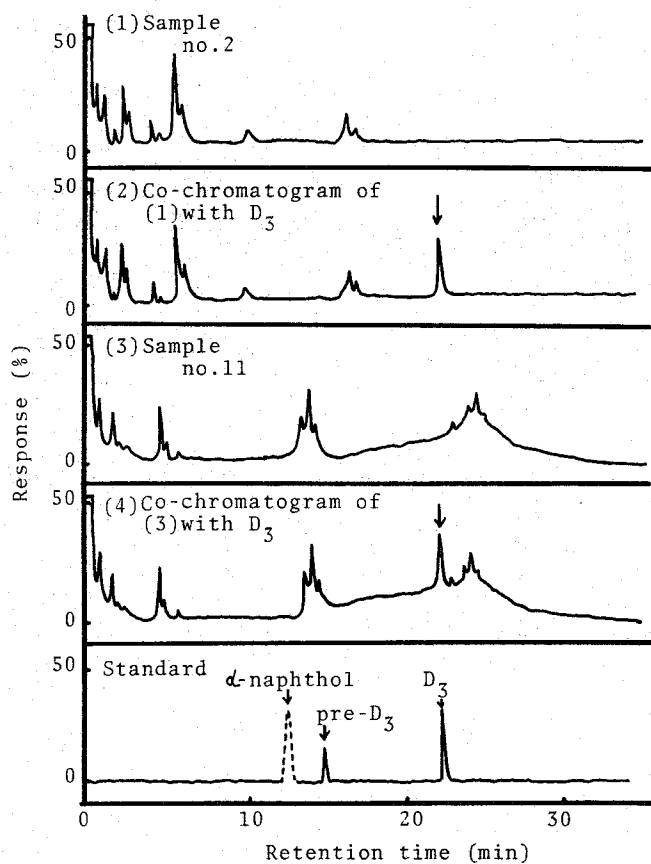
3.6 小 括

HPLC を用いて D の定量につき検討を行い、次のような結論を得た。

1. HPLC を用いて混合ビタミン剤等の D の定量法を確立した。所要時間は GLC 法にくらべやや短縮出来た。
2. HPLC では D 並びに pre-D は分離出来るので HPLC を用いることにより試料中の D 並びに pre-D の存在状態を明らかにした。
3. 牛乳中の D は D₃ であることを GC-MS 分析の結果より明らかとした。また、これまであまいであった牛乳中の D 含量を明らかにした。

4. GLC法とHPLC法との間には高度の相関性があることを明らかにした。

Fig. 35 High-performance liquid chromatograms of cow and human milks



第4章 ガスクロマトグラフィー並びに高速液体クロマトグラフィーによるプロビタミンDの定量

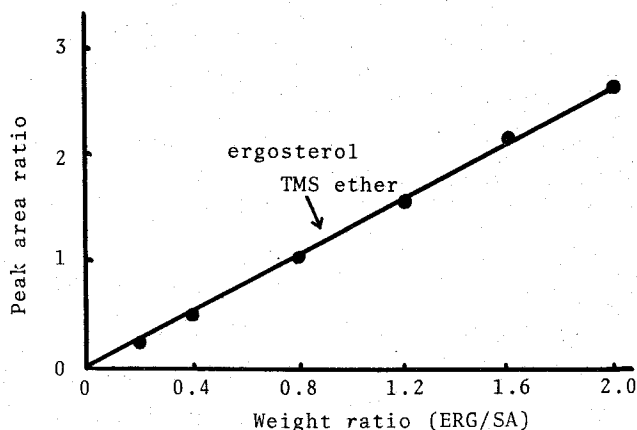
4.1 乾燥酵母中のエルゴステロールの定量

1920年頃になって、日光浴またはタラの肝油が、クル病に有効であることが臨床的に証明された。またSteenbock³⁴⁾らはラッテの食餌を照射してもクル病のネズミを照射するのと同様に有効であることを発見し、酵母、穀物類、牛乳などの食物の抗クル病性を紫外線照射により増加させる方法の特許を得ている。その後の研究によってタラの肝油にはDが含まれ、活性化できる食物には照射によってDにかえられるプロDが含まれることが明らかになった。しかし実際に定量を行っている報告はほとんどない。また、将来共にDを論ずる上でDの前駆体であるプロDを分析することは非常に重要なことである。そこで著者は乾燥酵母中のエルゴステロールの定量法につき検討を行った。

4.1.1 検量線

標準ERG 20, 40, 80, 120, 160, 200 $\mu\text{g/ml}$ とSA 100 $\mu\text{g/ml}$ を含むベンゼン・ピリジン(95:5)溶液の0.5 mlにつき第2章に関する実験の定量操作法3)の④(P 64)に従ってTMS化した後GLCに適用して検量線を作成した。(Fig. 36)

Fig. 36 Calibration curves of ergosterol TMS ether by the GLC



4.1.2 無照射乾燥酵母のガスクロマトグラフィーによるエルゴスロールの定量

無照射乾燥酵母試料⁶1を用いて定量条件の検討を行った。Fig. 37(I)は試料不けん化物を直接TMS化した結果であり、またFig. 37(II)はTLCに適用しERG画分をかきとりTMS化した時の結果である。両者の定量値はほぼ等しく、この結果を基にERGの定量には試料不けん化物を直接TMS化後GLCを行うことにした。前記で使用した無照射の乾燥酵母に標準ERGを1,500 $\mu\text{g/g}$ 添加したのち回収率を求めたところ、Table 27に示すように満足すべき結果が得られた。

Fig. 37 GLC behavior of non-irradiated dried yeast

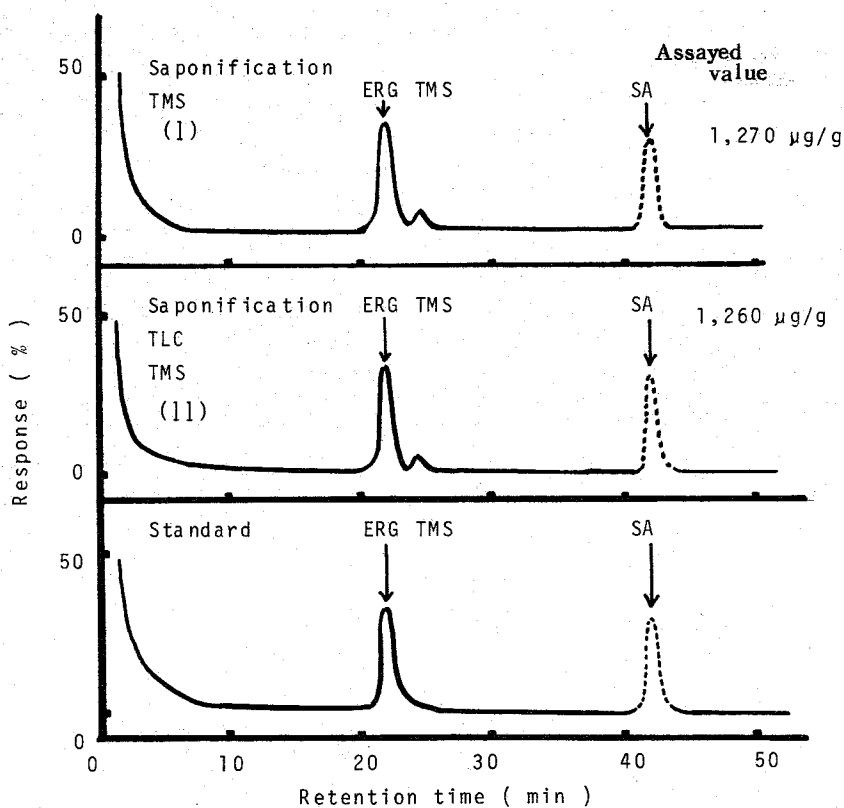


Table 27 Determination and recovery test of ergosterol in dried yeast

Trial	Assayed value of ergosterol ($\mu\text{g/g}$)				Recovery (%)
	Added value	With addition of ergosterol (A)	Without addition of ergosterol (B)	A-B	
1	1,500	2,820	1,350	1,470	98.0
2	1,500	2,820	1,200	1,620	108.0
3	1,500	2,770	1,270	1,500	100.0
4	1,500	3,030	1,540	1,490	99.3
5	1,500	2,770	1,200	1,570	104.7
M \pm SD			1,310 \pm 126		102.0 \pm 4

次に製造年月日の異なる乾燥酵母試料No.1～5中の無照射時におけるERG含量を定量した。
(Table 28) 定量値は910～1,310 $\mu\text{g/g}$ の範囲にあり製造年月日による差はあまり認められなかった。

Table 28 Assayed values of ergosterol in dried yeast

Trial	Assayed value of ergosterol ($\mu\text{g/g}$)				
	Sample				
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
1	1,350	1,020	1,020	940	1,180
2	1,200	1,100	1,050	880	1,180
3	1,270	1,010	940	870	1,270
4	1,540	1,020	1,040	1,020	1,190
5	1,200	1,120	1,200	840	1,300
M \pm SD	1,310 \pm 126	1,050 \pm 46	1,050 \pm 84	910 \pm 63	1,220 \pm 52

Date of preparation: Sample No. 1 1976. No. 2 1976. 2. Sample No. 3 1976. 9. No. 4 1977. 2. Sample No. 5 1977. 7.

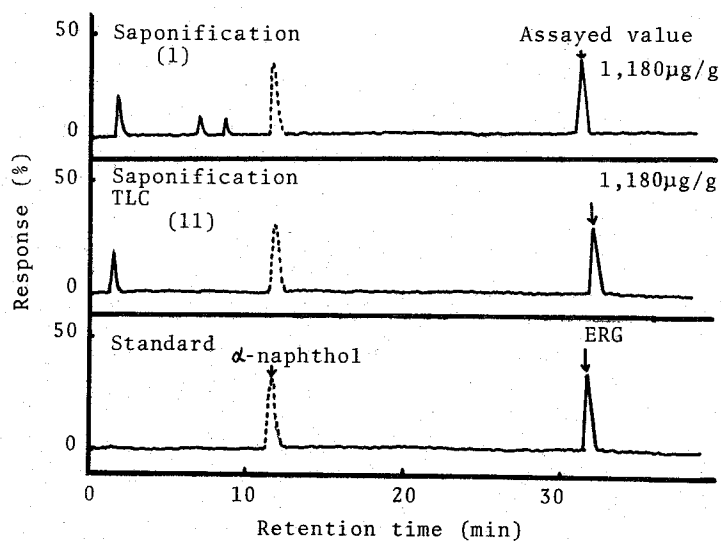
4.1.3 無照射乾燥酵母の高速液体クロマトグラフィーによるエルゴステロールの定量

無照射乾燥酵母試料No.5を用いて定量条件の検討を行った。(Fig. 38) GLCの場合と同様試料不けん化物を直接HPLCに適用することにした。

4.1.4 GLC法との比較

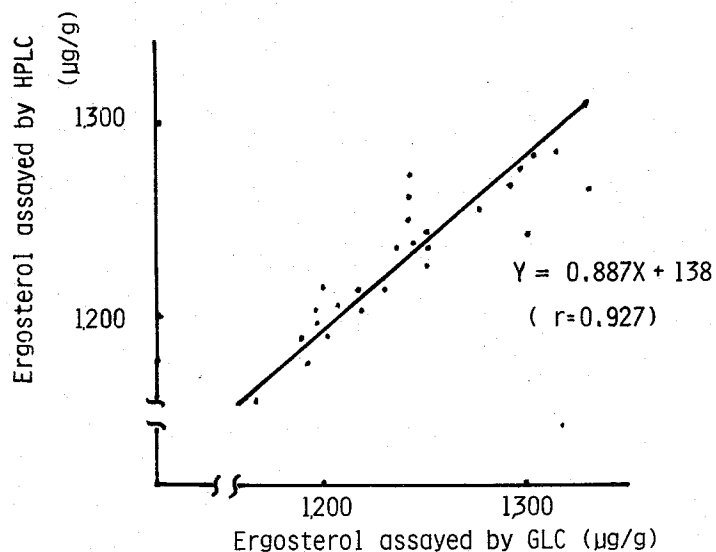
無照射乾燥酵母試料No.5を試料として、確立したGLC法並びにHPLC法で各々30回ずつE

Fig. 38 High-performance liquid chromatograms of dried yeast



R Gの定量を行い、両者の間の相関関係を調べた。(Fig. 39) 相関係数は0.927 であり、両法による結果の間には高度の相関関係があるとの結果を得た。

Fig.39 Correlation between Ergosterol values by GLC and HPLC methods



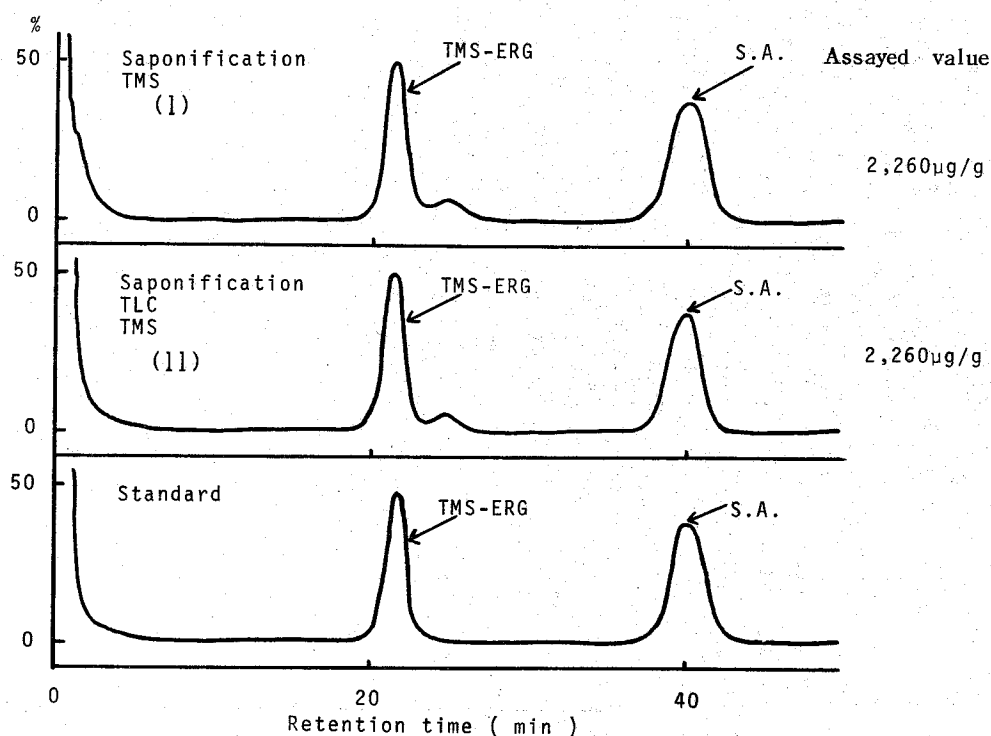
4.2 シイタケ中のエルゴステロールの定量

シイタケ中のERGの定量に関しては、小野³⁵⁾らによる比色法が報告されている。しかしながら比色法のため操作が煩雑で、かなりの時間を要する。そこで簡便且つ精度の高い方法を確立する目的で本研究を行った。

4.2.1 シイタケのガスクロマトグラフィーによるエルゴステロールの定量

乾燥シイタケの場合も乾燥酵母にならって定量条件の検討を行った。(Fig. 40) 結果は乾燥酵母と同様試料不けん化物を直接GLCに適用することにした。

Fig. 40 Gas chromatograms of dried "Shiitake"



次に、標準ERGを2,000 µg/g添加して回収率を求めたところ満足した結果が得られた。

(Table 29)

次に、和歌山、大分、愛媛、岩手、群馬から得られた乾燥シイタケ中のERG含量を定量した。

(Table 30) ERG含量にはかなりの個体差が認められた。

Table 29 Determination and recovery test of ergosterol in dried Shiitake

Trial	Assayed value of ergosterol ($\mu\text{g/g}$)				Recovery (%)
	Added value	With addition of ergosterol (A)	Without addition of ergosterol (B)	A-B	
1	2,000	3,970	1,880	2,090	104.5
2	2,000	3,910	1,920	1,990	99.5
3	2,000	4,000	1,980	2,020	101.0
4	2,000	3,860	1,940	1,920	96.0
5	2,000	3,830	1,860	1,970	98.5
M \pm SD			1,920 \pm 43		99, 9 \pm 2, 8

Table 30 Assayed values of ergosterol in dried Shiitake produced at different places

Place	Assayed value Ergosterol ($\mu\text{g/g}$)
Wakayama	3,900
Oita	7,360
Ehime	6,190
Iwate	2,510
Gunma	5,920

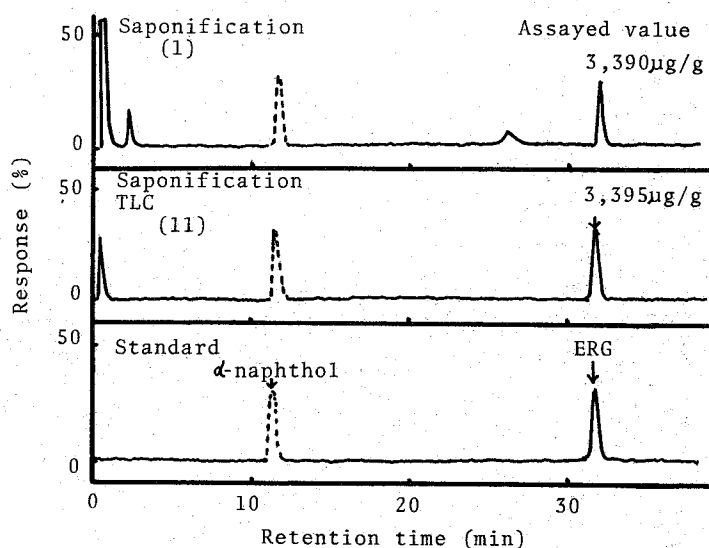
4.2.2 シイタケの高速液体クロマトグラフィーによるエルゴステロールの定量

HPLCを用いた場合も、GLCと同様、定量条件の検討結果 (Fig. 41) より試料不けん化物を直接HPLCに適用することにした。

4.3 牛乳中のプロビタミンDの定量

Hattinger³⁶⁾はUV照射牛乳は抗くる病性が大きく、小児に対して直接その身体にUVを照射すると同様の価値があると報告している。このように牛乳を照射する操作は古くから行われてきた。従ってプロDの存在についても古くから論じられている。²⁸⁾しかしながらプロDの定量に関する報告は全くない。牛乳中のプロDを分析することはDを論ずる上で必要不可欠のことである。そこで牛乳中のプロDの定量法を確立する目的で実験を行った。

Fig. 41 High-performance liquid chromatograms of dried shiitake



4.3.1 牛乳の高速液体クロマトグラフィーによるプロDの定量

牛乳試料No.2, 500mlに, 標準7-DHCを10μg添加し第4章に関する実験の定量操作法3) (P 71)に従って7-DHCの回収率を求めた。(Table 31)

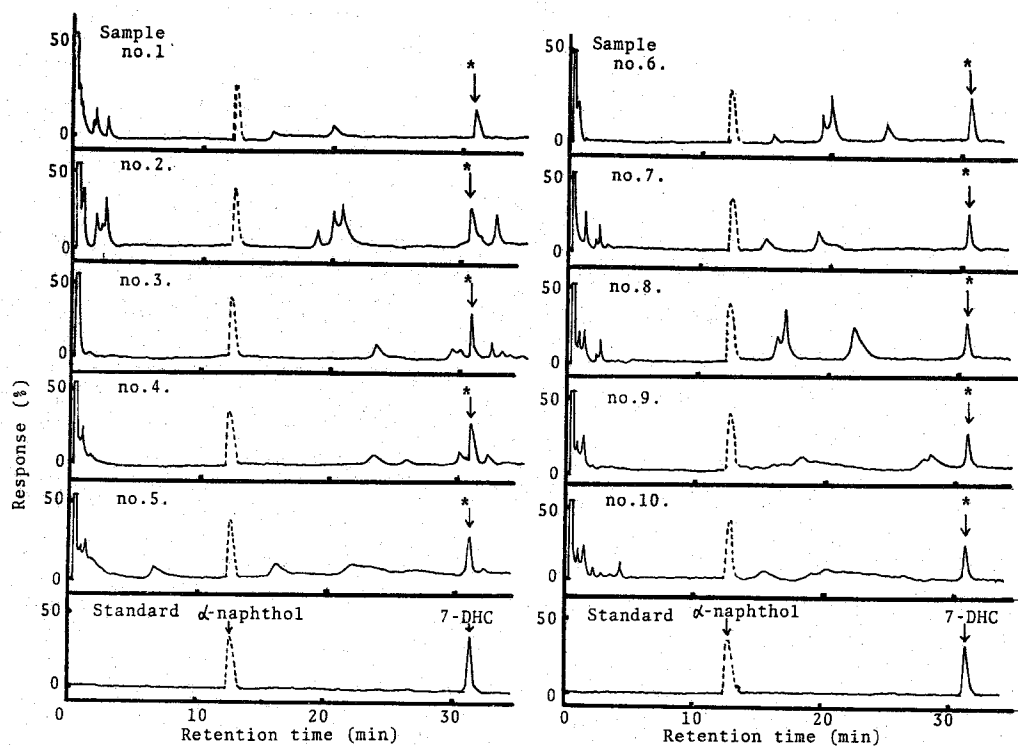
Table 31 Determination and recovery test of 7-DHC in cow's milk

Trial	Assayed value of 7-DHC (μg/l)			Recovery (%)
	Added value	with addition of 7-DHC (A)	without addition of 7-DHC (B)	
1	20	36	17	95.0
2	20	37	19	90.0
3	20	39	20	95.0
4	20	38	19	95.0
M±SD			19±1	93.8±2.2

次に試料No.1～10中のプロDの定量を行った。Fig. 42は定量した時の高速液体クロマトグラムを示している。Cochromatographyの結果プロDは7-DHCと一致した。これは後で述べるGC-MSの分析結果からも確認出来た。Table 32は定量値を示しており, 7-DHCは

14~56 $\mu\text{g}/\ell$ の範囲にあった。

Fig. 42 High-performance liquid chromatograms of cow's milk



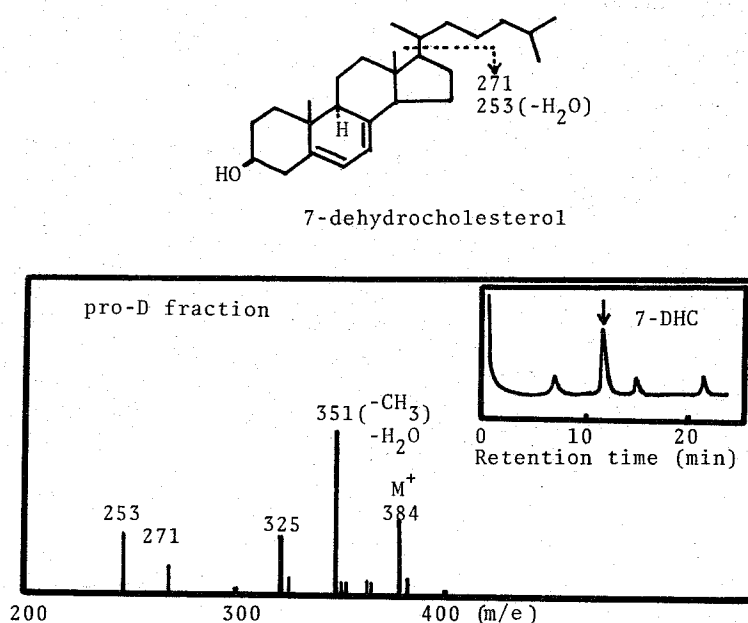
Tabl 32 Determination of 7-DHC in commercial cow's milk

Sample	Assayed value of 7-DHC ($\mu\text{g}/\ell$)	Sample	Assayed value of 7-DHC ($\mu\text{g}/\ell$)
No. 1	14	No. 6	47
No. 2	19	No. 7	44
No. 3	56	No. 8	37
No. 4	37	No. 9	18
No. 5	33	No. 10	21

4.3.2 GC-MS分析による牛乳中の7-DHCの確認

市販牛乳試料No.3の25ℓからGC-MS分析によるD₃の確認の際に得られた試料不けん化物につき、メタノール冷却、ジギトニン沈殿法によりステロール類を沈殿させた。この沈殿部分をTLCで精製しプロD画分を得た。この画分はGC-MS分析した結果(Fig.43), m/e 384の分子イオンピークをはじめ標準品のもとのその相対強度を比較することにより, 7-DHCであることを確認した。

Fig. 43 GC-MS of pro-D fraction in cow's milk



4.4 小 括

GLC並びにHPLCを用いてプロDの定量につき検討し, 次のような結論を得た。

1. GLC並びにHPLCを用いて乾燥酵母並びにシイタケ中のエルゴステロール並びに, HPLCを用いて牛乳中の7-デヒドロコレステロールの定量法を確立した。
2. シイタケ中並びに乾燥酵母中のエルゴステロール含量, 牛乳中の7-デヒドロコレステロール含量を明らかにした。
3. 牛乳中のプロ-Dは, 7-デヒドロコレステロールであることをGC-MS分析の結果より

明らかにした。

4. GLC法とHPLC法とによる結果の間には高度の相関性があることを明らかにした。

第5章 総 括

これまで混合ビタミン剤、食品等中のDの理化学的定量法は非常に困難とされてきており、USP³⁷⁾においても、また衛生試験法³⁸⁾に今だに比色法が採用されている。著者は煩雑な比色法にかわり、迅速且つ正確な定量法を確立する目的で種々検討を行った結果、GLC並びにHPLCを用いる定量法を確立した。幸せにもAD協会委員会の会員研究所で追試され、採用されるに至った。今後必要な部署で活用されるものと期待している。以下次のように要約できる。

1. GLC並びにHPLCを用いて混合ビタミン剤並びに食品中のDの定量法を確立した。所要時間はGLC法では3～4時間で、HPLC法では、さらにそれより少し短縮出来た。検討した範囲の試料について確立した定量法の操作の概略を表にまとめるとTable 33, 34のようになる。(Table 33はGLC法で、Table 34はHPLC法の場合である。)このように妨害物の種類並びに量により前処理方法をうまく使い分けることにより、巾広く食品中のDの定量が可能となる。
2. 動物試験法並びに比色法ではD₂とD₃の分別定量は不可能であったが、GLCを用いることにより両者の分別定量が可能となり、試料中のD₂並びにD₃の存在状態を明らかにすることが出来た。
3. D₂、A等の分解物を多く含む試料でも適用可能であったので、製剤中のDの安定性試験にも利用出来ることを明らかにした。
4. これまで不明な点が多かった牛乳のD含量を明確にすることが出来、栄養学の面において貢献することが出来た。古くから牛乳中にはD₂とD₃が存在すると報告されてきたが、牛乳中にはD₃のみが存在することをGC-MS分析の結果より明らかにした。また牛乳中のD前駆体、プロDは7-デヒドロコレステロールであることも併せて明らかにした。これらはDの代謝の研究に1つの知見を与える。
5. GLC並びにHPLCを用いてプロDの定量法を確立した。所要時間はGLC法では2.5時間HPLC法では2時間であった。定量法の操作の概略を表にまとめるとTable 35になる。
6. プロDを含む食品の紫外線照射の基礎的実験を行うことにより、乾燥酵母並びにシイタケ中のD含量を増加させることが出来た。
7. GLC法とHPLC法による結果の間には高度の相関性があることを明らかにした。

Table 33

Assay procedure for the determination of vitamin D in
the samples by GLC method

Assay procedure	Sample						
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Saponification and isolation of unsaponifiable matter	○	○	○	○	○	○	—
Phosphate-treated alumina column chromatography	×	○	×	×	×	×	—
Digitonin-celite column chromatography	×	×	○	○	×	○	—
Thin-layer chromatography	○	○	○	○	○	○	—
Trimethylsilylation	×	×	○	○	○	○	—
GLC	○	○	○	○	○	○	—

Sample (1): Multivitamins preparations I (Usual preparations)

(2): Multivitamins preparations II (Containing excess
amounts of vitamin E)

(3): Tuna liver oils

(4): Vitamin D₃ resin oils

(5): UVirradiated dried yeast

(6): UVirradiated dried shiitake

(7): Cow's and human milks

○は必要な操作法, ×は必要でない操作法

—は定量不可能

Table 34

Assay procedure for the determination of vitamin D in
the samples by HPLC method

Assay procedure	sample						
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Extraction of fat	×	×	—	×	×	×	○
Saponification and isolation of unsaponifiable matter	○	○	—	○	○	○	○
Phosphate-treated alumina column chromatography	×	○	—	×	×	×	×
Digitonin-celite column chromatography	×	×	—	×	×	×	○
Thin-layer chromatography	○	○	—	×	○	○	○
Trimethylsilylation	×	×	—	×	×	×	×
HPLC	○	○	—	○	○	○	○

Sample (1): Multivitamins preparations I (Usual preparations)

(2): Multivitamins preparations II (Containing excess amounts
of vitamin E)

(3): Tuna liver oils

(4): Vitamin D₃ resin oils

(5): UVirradiated dried yeast

(6): UVirradiated dried shiitake

(7): Cow's and human milks

Table 35

Assay procedure for the determination of
provitamin D in the samples by GLC and HPLC methods

Assay procedure	Sample		
	(1)	(2)	(3)
Extraction of fat	× (×)	× (×)	(○)
Saponification and isolation of unsaponifiable matter	○ (○)	○ (○)	(○)
Thin-layer chromatography	× (×)	× (×)	(○)
Trimethylsilylation	○ (×)	○ (×)	(×)
GLC (HPLC)	○ (○)	○ (○)	(○)

Sample (1): Dried yeast

(2): Dried shiitake

(3): Cow's milk

()内はHPLC法の場合を示す。

謝 辞

本研究に際して終始御懇篤なる御指導を賜りました神戸女子薬科大学小林 正教授に心より感謝致します。御鞭撻御激励を賜りました神戸女子薬科大学長金子太郎教授に深謝致します。また、本論文の作成に際し終始御指導御鞭撻を賜りました京都大学薬学部富田謙吉教授に心より感謝致します。あたたかい御助言と御指導を賜りました京都大学薬学部宇野豊三教授に深謝致します。

又、貴重なサンプルを御恵与下さいました Philips-Duphar 社 F. J. Mulder 博士，岩手医科大学若生 宏教授，神戸大学医学部児玉莊一博士，雪印乳業株式会社，エビオス薬品工業株式会社に感謝致します。

最後にあたたかい御助言と御鞭撻を賜りました神戸女子薬科大学の諸先生方並びに本実験に御協力下さいました衛生化学教室の方々に感謝致します。

実 験 の 部

第2章に関する実験

1. 試薬及び化合物

- ① D_2 並びに D_3 : Philips-Duphar社製市販品をアセトン・水(4:1)より再結晶して使用。 D_2 mp 115~116°C, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$, 265nm 475 (エタノール中); D_3 mp 85~86°C, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$, 265nm 483 (エタノール中)。
- ② Stigmasteryl acetate (SA) : 半井化学薬品社製市販品の Stigmasterol を常法に従いアセチル化しエタノールより再結晶して使用。mp 144°C, これは GLC用内部標準物質として使用。
- ③ Cholesteryl acetate (CA) : 半井化学薬品社製市販品の cholesterol を常法に従いアセチル化しアセトンより再結晶して使用。mp 116°C これはSAと同様GLC用内部標準物質として使用。
- ④ A palmitate (約1,650,000 IU/g) : 河合製薬より譲り受けたものを使用。
- ⑤ E (DL- α -tocopheryl acetate, 第8改正日本薬局法) : エーザイより譲り受けたものを使用。
- ⑥ Kieselgel GF₂₅₄ : Merck社製市販品 (TLC用の吸着剤)
- ⑦ 無アルデヒドエタノール : エタノール1ℓにつき50% KOH溶液5ml並びに亜鉛末5gを加えて, 2時間還流の後蒸留して使用する。
- ⑧ Phosphate-treated alumina : Mulder⁴⁾に従って調製する。
- ⑨ 石油エーテル : KOH粒と還流させた後蒸留し, 留分40~60°Cを使用。
- ⑩ エチルエーテル : 常法に従い過酸化物を除去したものを使用。
- ⑪ Celite 545 : John-Manville 社製市販品を使用。
- ⑫ ジギトニン : Merck社製特級品を使用。
- ⑬ ピリジン : 半井化学薬品社製特級品を蒸留して使用。
- ⑭ n-ヘキサン : 半井化学薬品社製特級品を蒸留して使用。
- ⑮ TMS化剤 : ヘキサメチルジシラザンとトリメチルクロロシランは半井化学薬品社製市販品を使用。
- ⑯ Nield試薬 : Mulder⁴⁾に従って調製。

その他は特級品を使用する。

2. 試 料

1) 通常の混合ビタミン剤

市販混合ビタミン剤（錠剤またはカプセル剤）で D_2 , A , 試料 $\#5$ を除いて E 並びに B_1 , B_2 , B_6 , B_{12} , C 等の水溶性ビタミン, ニコチン酸アミド, 無機質等を含み, 試料 $\#1$ は D_2 表示量が 250 IU/錠で $A/D = 10$, $E/D = 160$ である。 $\#2$ は D_2 表示量が 400 IU/カプセルで $A/D = 5$, $E/D = 500$ である。 $\#3$ は D_2 表示量が 200 IU/錠で $A/D = 12.5$, $E/D = 220$ である。 $\#4$ は D_2 表示量が 400 IU/3錠で $A/D = 10$, $E/D = 446$ である。 $\#5$ は D_2 表示量が 250 IU/カプセルで $A/D = 10$ である。

2) ビタミンE含量の多い混合ビタミン剤

市販混合ビタミン剤カプセルで D_2 , A , E , B_1 , B_2 , B_6 , B_{12} , C , ニコチン酸アミド, 乳酸カルシウムを含み, D_2 表示量は 400 IU/カプセルで $A/D = 5$, $E/D = 4,310$ である。
(試料 $\#6$)

3) マグロ肝油

理研ビタミン K.K. より譲り受けたものであり, A 含量は第 8 改正日本薬局方に記載の方法により定量したところ, 95,300 IU/g であった。

4) D_3 樹脂

試料 $\#1 \sim 8$ は D_3 表示量が 100,0000 IU/g で, $\#9 \sim 16$ は 10,000 IU/g で各々の試料はピーナツオイルに溶かされている。AOAC の定量に関する共同研究の試料として Dr. Mulder より譲り受けたものである。

5) 乾燥酵母

エビオス薬品工業製, 乾燥酵母試料 $\#1$ (1976 年製造, 製造年月日は不明), $\#2$ (1976 年 2 月製造), $\#3$ (1976 年 9 月製造), $\#4$ (1977 年 2 月製造), $\#5$ (1977 年 7 月製造) を使用。

6) シイタケ

すべて市販乾燥シイタケを購入して使用。

3. 定量操作法

1) 通常の混合ビタミン剤

定量操作法の概略はけん化及び不けん化物の分離 \rightarrow TLC \rightarrow GLC である。

① けん化及び不けん化物の分離：試料が錠剤又はカプセル剤の場合は乳鉢中にとり、粉碎したのち、また試料が粉末剤の場合は、そのまま、それぞれD 60 IU以上に相当する量を300 mlのけん化フラスコ中に精秤して入れる。これに5 %アスコルビン酸ナトリウム溶液 20 mlを加え、水浴中80℃以上の温度で約10分間加温しながら 静かに振り混ぜて試料を分散させる。試料が油状溶液またはその他の溶液状のものは、前記の操作を省略して精秤した試料を直ちに以下の操作に供する。無アルデヒドエタノール50 ml, 20 %ピロガロール・エタノール溶液 20 ml及び90% (W/V) KOH溶液 8 mlをけん化フラスコに加え、冷却管を付して30分間水浴中80℃以上の温度でけん化する。けん化終了後直ちに室温まで冷却し、ベンゼン100 mlを正確に加えてMulder³⁹⁾らのBenzene washingの方法に従って不けん化物を抽出分離する。

② TLC：前記①で得たベンゼン抽出液の50～75 mlを正確に100 mlの丸底フラスコにとり、溶媒を減圧留去し(40℃以下)、残渣にアセトン1.0 mlを加えて溶かす。このアセトン溶液0.2 mlをマイクロピペットでとり、kieselgel GF₂₅₄の薄層板(20×20 cm, 厚さ300 μ, 105℃で1時間活性化させたもの)上に帯状にスポットする。同じ薄層板の左端にTLC用D標準溶液(Dの20,000 IU/ml二塩化エチレン溶液を30分間還流したもの。)をスポットし、n-ヘキサン・酢酸エチル(4:1)で展開し、254nmのUV照射により 検出されたDとpre-Dの画分をかき取りアセトン30 mlで抽出後濾過し、溶媒を減圧留去する。

③ GLC：前記②で得た残渣にGLC用内部標準溶液(SAをアセトンに溶かし50 μg/mlとしたもの)0.5 mlを加えて溶解しGLC用検液とする。又別にGLC用D標準溶液(D及びSAをアセトンに溶解し、D濃度1,600 IU/ml, SA濃度50 μg/mlとしたもの)を作りこれらの5 μlを各マイクロシリンジでとり下記条件に設定したガスクロマトグラフに注入する。

装置：島津GC-4B PFE水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフを使用した。

カラム：充填剤として1.5 %OV-17 Gas Chrom Q(80～100メッシュ, 和光純薬市販品)を選びこれを0.4×150 cmのガラスカラムに充填したものを使用した。

温度：カラム225°～240℃, 試料注入口250℃, 検出器300℃

キャリアーガス(N₂)の流速：80～120 ml/min

④ 計算：GLC用検液及びGLC用D標準溶液において、SAに対するpyro-Dのピーク面積比を半値幅法で求め、次式により試料中のD量を計算する。

$$D \text{ 含量 (IU/g, 錠またはカプセル)} = \frac{R_{sa}}{R_{st}} \times S \times 0.5 \times \frac{V}{W}$$

R_{sa} : GLC用検液のピーク面積比。(pyro-D/SA)

R_{st} : GLC用D標準溶液のピーク面積比。(pyro-D/SA)

S : GLC用標準溶液のD濃度 (IU/ml)

V : 換算係数

W : 試料秤取量 (g,錠,またはカプセル)

2) E含量の多い混合ビタミン剤

定量操作法の概略はけん化及び不けん化物の分離→Phosphate-treated alumina カラムクロマトグラフィー→TLC→GLCである。

① けん化及び不けん化物の分離: 1)の①に従って操作する。(P 62)

② Phosphate-treated alumina (PTA)カラムクロマトグラフィー: Mulder⁴⁾らに従ってPTAカラムを調製した。PTA 30 gに水 1.5 mlを加えて不活性化したものを2.0 × 30 cmのカラムに石油エーテルを用いてつめて作る。前記①で得たベンゼン抽出液 50~75 mlを100 mlの丸底フラスコに正確にとり溶媒を減圧留去する。残渣を石油エーテル 5 mlに溶かし, PTAカラムに石油エーテル 15 mlを用いて移す。200 mlの8%エーテル・石油エーテル混液を4~5 ml/分の流速で流して, この溶出液を捨てたのち, 更に30%エーテル・石油エーテル混液 100 mlを同じ速度で流し, この溶出液を集める。溶媒を減圧留去したのち, 残渣にアセトン 1.0 mlを加えて溶解する。

③ TLC: 1)の②に従って操作する。(P. 62)

④ GLC: 1)の③に従って操作する。(P. 62)

⑤ 計算: 1)の④に従って操作する。(P. 62)

3) マグロ肝油並びにD₃ 樹脂油

定量操作法の概略はけん化及び不けん化物の分離→ジギトニン・セライトカラムクロマトグラフィー→TLC→TMS化→GLCである。

① けん化及び不けん化物の分離: 試料約 1 gを精秤して300 mlのけん化フラスコに入れ 1)の①に従って操作する。(P. 62)

② ジギトニン・セライトカラムクロマトグラフィー: Sheppard⁴⁰⁾らに従ってジギトニン・セライトカラムを調整した。110°Cで6時間乾燥させたセライト 545の10 gにジギトニン 60 mg/ml溶液 5 mlを加えて均等になるまで混和する。このジギトニン・セライト 3 gを1 × 20 cmのガラスカラムに適当量のn-ヘキサンを用いて流し込み, カラムの上端から圧をかけて均質になるように充填する。前記①で得た不けん化物のベンゼン溶液の 50~75 mlを正確にとり溶媒を減圧留去したのち(40°C以下), 残渣にn-ヘキサン 5 mlを加えて溶解し, ジギトニン・セライトカラムに移す。n-ヘキサンを5 mlずつ数回加えて溶出し, 初めからの溶出液 50 mlをとる。溶媒を減圧留去後, 残渣にアセトン 1.0 mlを加えて溶解する。

③ TLC : 1) の②に従って操作する。(P. 62)

④ TMS化: 前記③で得た残渣に内部標準溶液(D₃系の場合はCAをD₂系ではSAをベンゼン・ピリジン-95:5に溶かし100 µg/mlとしたもの。)0.5 mlを加えて溶解しヘキサメチルジシラザン0.5 ml及びトリメチルクロロシラン0.1 mlを加えて10分間室温中で放置したのち、15分間遠心分離し上澄液をGLC用検液とする。

⑤ GLC: 1) の③に従って操作する。(P. 62)

GLC用標準溶液はD 3,200 IU/ml, SA又はCA 100 µg/mlのベンゼン・ピリジン(95:5)溶液の0.5 mlにつき前記④に従って操作したものとする。前記④で得たGLC用検液またはGLC用標準溶液の5 µlをマイクロシリンジでとりGLCに適用する。

⑥ 計算: GLC用検液及びGLC用標準溶液において、SAに対するpyro-D TMSのピーク面積比を半値幅法で求め、次式より試料中のD量を計算する。

$$D \text{ 含量 (IU/g)} = \frac{R_{sa}}{R_{st}} \times S \times 0.5 \times \frac{V}{W}$$

R_{sa}: GLC用検液のピーク面積比, (pyro-D TMS/SA又はCA)

R_{st}: GLC用D標準溶液のピーク面積比 (pyro-D TMS/SA又はCA)

S: GLC用D標準溶液のD濃度 (IU/ml)

V: 換算係数

W: 試料秤取量 (g)

4) 照射乾燥酵母

定量操作法の概略はけん化及び不けん化物の分離→TLC→TMS化→GLCである。

① けん化及び不けん化物の分離: 試料約10 gを精秤して500 mlのけん化フラスコに入れ1)の①に従って操作する。(P. 62) 但し、秤取量が多いので加える試薬はすべて倍量とする。

② TLC: 1) の②に従って操作する。(P. 62)

③ TMS化: 3) の④に従って操作する。(内部標準物質にはSAを使用。)(P. 64)

④ GLC: 3) の⑤に従って操作する。(P. 64)

⑤ 計算: 3) の⑥に従って操作する。(P. 64)

5) 照射シイタケ

定量操作法の概略はけん化及び不けん化物の分離→ジギトニン・セライトカラムクロマトグラフィー→TLC→TMS化→GLCである。

① けん化及び不けん化物の分離: 可食部をミキサーで粉末状とし、その約10 gを精秤して500 mlのけん化フラスコに入れ1)の①に従って操作する。(P. 62) 但し、秤取量が多いので加える試薬はすべて倍量とする。

- ② ジギトニン・セライトカラムクロマトグラフィー：シイタケ試料をUV照射した場合，照射線量が比較的多い場合はこの操作を省略する。しかし照射線量が非常に少ない場合， D_2 の生成量が少なく，したがって D_2 に対するERGの相対比が大きくなり妨害を受けるので，3)の②に従って操作し(P. 63) ジギトニン・セライトカラムでERGの除去を行う。
- ③ TLC：1)の②に従って操作する。(P. 62)
- ④ TMS化：3)の④に従って操作する。(内部標準物質にはSAを使用。)(P. 64)
- ⑤ GLC：3)の⑤に従って操作する。(P. 64)
- ⑥ 計算：3)の⑥に従って操作する。(P. 64)

第3章に関する実験

1. 試薬及び化合物

- ① α -ナフトール：半井化学薬品社製特級品。これはHPLC用の内部標準物質として使用。
- ② n-ペンタン：半井化学薬品社製特級品を使用。
- ③ Triton X-100 溶液：Bell⁴¹⁾らの方法に従い調製。

その他は第2章に関する実験の試薬及び化合物と同じものを使用。(P. 60)

2. 試料

1) 通常の混合ビタミン剤

試料 κ .2 (P. 61)及び κ .7 (D_2 表示量は200 IU/錠 $A/D=10$, $E/D=220$)を使用。

2) ビタミンE含量の多い混合ビタミン剤

試料 κ .6 (P. 61)を使用。

3) マグロ肝油

第2章で使用したものと同じものを使用。(P. 61)

4) D_3 樹脂油

試料 κ .1～5 (P. 61)を使用。

5) 乾燥酵母

試料 κ .2 及び κ .5 (P. 61)を使用。

6) シイタケ

市販乾燥シイタケを購入して使用。

7) 牛乳並びに母乳

試料No.1～8は牛乳，試料No.9，10は加工乳である。試料No.11～13はいずれも複数の母親から集めた母乳である。

3. 定量操作法

1) 通常の混合ビタミン剤

定量操作法の概略はけん化及び不けん化物の分離→TLC→HPLCである。

① けん化及び不けん化物の分離：第2章に関する実験の定量操作法の1)の①(P.62)に従って操作する。但しGLCよりHPLCの方が感度がよいので試料秤取量はD6 IU以上に相当するものでよい。

② TLC：第2章に関する実験の定量操作法の1)の②(P.62)に従って操作する。

③ HPLC：前記②で得た残渣にHPLC用内部標準溶液(α-ナフトールをn-ペンタンに溶かし20 μg/mlとしたもの。)0.5 mlを加えて溶解しHPLC用検液とする。このHPLC用検液の10 μlをマイクロシリンジでとり，下記条件に設定したHPLCに適用する。なおこのHPLCの分析条件は月田¹⁰⁾らに従った。また別にD200 IU/ml，α-ナフトール 20 μg/mlのn-ペンタン溶液をHPLC用D標準溶液としその10 μlを同様HPLCに適用する。

装 置：島津Du Pont 841

検出器：UV検出器(254nm)

カラム：充填剤としてZorbax Sil (25cm×2.1mm i.d.)

圧 力：60～100 Kg/cm² (流速0.6 ml/min)

溶出液：メタノール1.5 ml及びエーテル20 mlをn-ペンタンに溶かし全量を1 ℓとする。

④ 計 算：前記③で得られた高速液体クロマトグラムでの内部標準物質(α-ナフトール)に対するD及びpre-Dのピーク面積比を半値幅法により各々求め次式よりD₂含量を計算する。

$$D \text{ 含量 (IU/g)} = \left(\frac{R_{sa}}{R_{st}} + \frac{R_{sa'}}{R_{st} \times 0.45} \right) \times S \times 0.5 \times \frac{V}{W}$$

R_{sa} : HPLC用検液のDに関するピーク面積比 (D/α-ナフトール)

R_{sa'} : HPLC用検液のpre-Dに関するピーク面積比 (pre-D/α-ナフトール)

R_{st} : HPLC用D標準溶液のピーク面積比 (D/α-ナフトール)

S : HPLC用D標準溶液のD濃度 (IU/ml)

V : 換算係数

W : 試料秤取量 (ml, g,錠またはカプセル)

前述のように Keverling Buisman¹⁾らはDが加熱によって一部が容易に pre-D になることから、Dのみの定量値を actual D 値、D と pre-D の定量値の合計を potential D 値（広義のD）と定義し、常に potential D 値を計算することが試料中のDを評価するための最善の策ではないかと提案している。GLCにおいてはD及び pre-D（それらのTMS化されたものも同様）はともに同一態度で熱異性化されて pyro-D 及び isopyro-D の2つのピーク（ピークの比は 1.7 : 1）を定量的に与えるので、いずれかを利用して定量すれば、potential D 値が求められる。しかしながら、HPLCでは、D と pre-D は分離するので、両者を合計した値をD値としなければならない。

2) ビタミンEを多量に含む混合ビタミン剤

定量操作法の概略はけん化及び不けん化物の分離→PTAカラムクロマトグラフィー→TLC→HPLCである。

- ① けん化及び不けん化物の分離：第2章に関する実験の定量操作法の1) (P. 62)に従って操作する。試料採取量はD 6 IU以上に相当するものでよい。
- ② PTAカラムクロマトグラフィー：第2章に関する実験の定量操作法の2) の② (P. 63)に従って操作する。
- ③ TLC：第2章に関する実験の定量操作法の1) の② (P. 62)に従って操作する。
- ④ HPLC：1) の③に従って操作する。(P. 66)
- ⑤ 計算：1) の④に従って操作する。(P. 66)

3) マグロ肝油並びにD₃ 樹脂油

定量操作法の概略はけん化及び不けん化物の分離→ジギトニン・セライトカラムクロマトグラフィー→TLC→HPLCである。

- ① けん化及び不けん化物の分離：試料約 0.1 g を精秤してけん化フラスコに入れ第2章に関する実験の定量操作法の1) (P. 62)に従って操作する。
- ② ジギトニン・セライトカラムクロマトグラフィー：第2章に関する実験の定量操作法の3) の② (P. 63)に従って操作する。(D₃ 樹脂油の場合は省略する。)
- ③ TLC：第2章に関する実験の定量操作法の1) の② (P. 62)に従って操作する。(D₃ 樹脂の場合は省略する。)
- ④ HPLC：1) の③に従って操作する。(P. 66)
- ⑤ 計算：1) の④に従って操作する。(P. 66)

4) 照射乾燥酵母

定量操作法の概略はけん化及び不けん化物の分離→TLC→HPLCである。

① けん化及び不けん化物の分離：試料約1gを精秤してけん化フラスコに入れ第2章に関する実験の定量操作法の1)の①(P.62)に従って操作する。

② TLC：第2章に関する実験の定量操作法の1)の②(P.62)に従って操作する。

③ HPLC：1)の③に従って操作する。(P.66)

④ 計算：1)の④に従って操作する。(P.66)

5) 照射シイタケ

定量操作法の概略はけん化及び不けん化物の分離→TLC→HPLCである。

① けん化及び不けん化物の分離：可食部をミキサーで粉末状とし、その約1gを精秤してけん化フラスコに入れ第2章に関する実験の定量操作法の1)の①(P.62)に従って操作する。

② TLC：第2章に関する実験の定量操作法の1)の②(P.62)に従って操作する。

③ HPLC：1)の③に従って操作する。(P.66)

④ 計算：1)の④に従って操作する。(P.66)

6) 牛乳並びに母乳

定量操作法の概略はD並びにプロDを含む脂質画分の抽出→けん化及び不けん化物の分離→ジグトニン・セライトカラムクロマトグラフィー→TLC→HPLCである。

① D並びにプロDを含む脂質画分の抽出：牛乳または母乳500mlを1ℓの三角フラスコにとる。次にTriton X-100 溶液⁴¹⁾50mlを加えて、水溶液中で(水溶温度80℃以上)10分間加温する。冷後エタノール200mlを加えて混和する。続いて第一の分液ロートに注ぎこみ、エーテル・石油エーテル(1:1)250mlの一部で数回容器を洗いこみ、洗液を第一の分液ロートに合す。残りのエーテル・石油エーテルを第一の分液ロートに注ぎ振り混ぜ、二層が分離するのを待つ。分離した有機溶媒層(上層)を第二の分液ロートに移す。水層をもう一度エーテル・石油エーテル(1:1)250mlで抽出する。分離した有機溶媒層を第二の分液ロートに移し水分の分離を待つ。ここで得られた有機溶媒層を丸底フラスコに集め溶媒を留去する。

② けん化及び不けん化物の分離：第2章に関する実験の定量操作法の1)の①(P.62)に従って操作する。但し加える試薬はすべて倍量とする。

③ ジグトニン・セライトカラムクロマトグラフィー：第2章に関する実験の定量操作法の3)の②(P.63)に従って操作する。

④ TLC：第2章に関する実験の定量操作法の1)の②(P.62)に従って操作する。

⑤ HPLC：1)の③に従って操作する。(P.66)

⑥ 計算：1)の④に従って操作する。(P.66)

第4章に関する実験

1. 試薬及び化合物

- ① Ergosterol (ERG) : Sigma 社製市販品をエタノールより再結晶して使用。

mp 168°C

- ② 7-dehydrocholesterol (7-DHC) : Fluka 社製市販品をエーテルより再結晶して使用。mp 150~151°C

その他は第2章並びに第3章に関する実験の試薬及び化合物と同じものを使用。(P. 60, 65)

2. 試料

1) 乾燥酵母

試料 No. 1~5 (P. 61) を使用。

2) シイタケ

市販乾燥シイタケを購入して使用。

3) 牛乳

試料 No. 1~10 (P. 65) を使用。

3. GLCによる定量操作法

1) 乾燥酵母

- ① けん化及び不けん化物の分離 : 試料約 10 g を精秤して 500 ml のけん化フラスコに入れ第2章に関する実験の定量操作法 1) の① (P. 62) に従って操作する。この操作で得た不けん化物のベンゼン溶液 1.0 ml をとり、ベンゼンで正確に 10 倍希釈したのちその 4.0 ml をとり溶媒を減圧留去したのち、残渣に内部標準溶液 (SA をベンゼン・ピリジン 95:5 に溶かし 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ としたもの。) 0.5 ml を加えて溶解する。

- ② TMS 化 : 第2章に関する実験の定量操作法の 3) の④ (P. 64) に従って操作する。

- ③ GLC : 第2章に関する実験の定量操作法の 1) の③ (P. 62) に従って操作する。GLC 用 ERG 標準溶液は ERG 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, SA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のベンゼン・ピリジン (95:5) 溶液の 0.5 ml につき第2章に関する実験の定量操作法の 3) の④ (P. 64) に従って TMS 化を行ったものとする。

- ④ 計算 : GLC 用検液及び GLC 用 ERG 標準溶液において、SA に対する ERG-TMS のピーク面積比を半値幅法で求め、次式より試料中の ERG 含量を計算する。

$$\text{ERG 含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{R_{sa}}{R_{st}} \times S \times 0.5 \times \frac{V}{W}$$

R_{sa} : GLC用検液のピーク面積比(ERG-TMS/SA)

R_{st} : GLC用ERG標準溶液のピーク面積比(ERG-TMS/SA)

S : GLC用ERG標準溶液のERG濃度($\mu\text{g/ml}$)

V : 換算係数

W : 試料秤取量(g)

2) シイタケ

- ① けん化及び不けん化物の分離：試料約10gを精秤して500mlのけん化フラスコに入れ、第2章に関する実験の定量操作法の1)の①(P. 62)に従って操作する。この操作で得た不けん化物のベンゼン溶液1.0mlをとり、ベンゼンで正確に10倍希釈したのち、その2.0mlをとり、溶媒を減圧留去したのち、残渣に内部標準溶液(SAをベンゼン・ピリジン-95:5に溶かし100 $\mu\text{g/ml}$ としたもの。)0.5mlを加えて溶解する。
- ② TMS化：第2章に関する実験の定量操作法の3)の④(P. 64)に従って操作する。
- ③ GLC：第2章に関する実験の定量操作法の1)の③(P. 62)に従って操作する。
- ④ 計 算：前記1)の④(P. 69)に従って操作する。

4. HPLCによる定量操作法

1) 乾燥酵母

- ① けん化及び不けん化物の分離：試料約1gを精秤して300mlのけん化フラスコに入れ、第2章に関する実験の、定量操作法1)の①(P. 62)に従って操作する。
- ② HPLC：第3章に関する実験の定量操作法の1)の③(P. 66)に従って操作する。また、HPLC用ERG標準溶液はERG 20 $\mu\text{g/ml}$ 、 α -ナフトール 20 $\mu\text{g/ml}$ のn-ペンタン溶液をHPLC用ERG標準溶液とする。
- ③ 計 算：HPLC用検液及びHPLC用ERG標準溶液において、 α -ナフトールに対するERGのピーク面積比を半値幅法により求め、次式よりERG含量を計算する。

$$\text{ERG 含量}(\mu\text{g/g}) = \frac{R_{sa}}{R_{st}} \times S \times 0.5 \times \frac{V}{W}$$

R_{sa} : HPLC用検液のピーク面積比(ERG/ α -ナフトール)

R_{st} : HPLC用ERG標準溶液のピーク面積比(ERG/ α -ナフトール)

S : HPLC用ERG標準溶液のERG濃度($\mu\text{g/ml}$)

V : 換算係数

W : 試料秤取量(g)

2) シイタケ

- ① けん化及び不けん化物の分離：試料約1gを精秤して300mlのけん化フラスコに入れ，第2章に関する実験の定量操作法の1)の①(P.62)に従って操作する。
- ② HPLC：前記4，1)の②(P.70)に従って操作する。
- ③ 計 算：前記4，1)の③(P.70)に従って操作する。

3) 牛 乳

- ① D並びにプロDを含む脂質画分の抽出：第3章に関する実験の定量操作法の6)の①(P.68)に従って操作する。
- ② けん化及び不けん化物の分離：第2章に関する実験の定量操作法の1)の①(P.62)に従って操作する。この操作で得た不けん化物のベンゼン溶液30mlを正確にとり溶媒を減圧留去する。
- ③ TLC：第2章に関する実験の定量操作法の1)の②(P.62)に従って操作する。
- ④ HPLC：前記1)の②(P.70)に従って操作する。またHPLC用7-DHC標準溶液は7-DHC 20 μ g/ml， α -ナフトール20 μ g/mlのn-ペンタン溶液をHPLC用7-DHC標準溶液とする。
- ⑤ 計 算：HPLC用検液及びHPLC用7-DHC標準溶液において α -ナフトールに対する7-DHCのピーク面積比を半値幅法により求め，次式より7-DHC含量を計算する。

$$7\text{-DHC含量}(\mu\text{g/ml}) = \frac{R_{sa}}{R_{st}} \times S \times 0.5 \times \frac{V}{W}$$

R_{sa} ：HPLC用検液のピーク面積比(7-DHC/ α -ナフトール)

R_{st} ：HPLC用7-DHC標準溶液のピーク面積比(7-DHC/ α -ナフトール)

S ：HPLC用7-DHC標準溶液の7-DHC濃度(μ g/ml)

V ：換算係数

W ：試料秤取量(g)

文 献

- 1) Keverling Buisman, J. A. Hanewald, K. H., Mulder, F. J., Roborgh, J. R., Keuning, K. J. : J. Pharm. Sci., 57, 1326 (1968)
- 2) USP XVI, p 910 (1960)
- 3) Nield, C. H., Russel, W. C., Zimmerli, A. : J. Biol. Chem., 136, 73 (1940); Bewitt, J. B., Sullivan, M. X. : Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 18, 117 (1946)
- 4) Mulder, F. J., de Vries, E. J. : J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 57, 1349 (1974)
- 5) Ueda, F., Makino, J., Kazama, A., Watanabe, K. : J. Vitaminol., 17, 142 (1971)
- 6) Ziffer, H., Vauden Heuvel, W. J. A., Haahti, E. O. A., Horning, E. C. : J. Am. Chem. Soc., 82, 6411 (1960)
- 7) Avioli, L. V., Lee, S. W. : Anal. Biochem., 16, 193 (1966)
- 8) Tartivita, K. A., Sciarello, J. P., Rudy, B. C. : J. Pharm. Sci., 65, 1024 (1976)
- 9) Tomkins, D. F., Tscherne, R. J. : Anal. Chem., 46, 1602 (1974)
- 10) Tsukida, K., Kodama, A., Saiki, K. : J. Nutr. Sci. Vitaminol., 22, 15 (1976)
- 11) Hofsass, H., Grant, A., Alicino, N. J., Greenbaum, S. B. : J. Ass. Offic. Anal. Chem., 59, 251 (1976)
- 12) Thompson, J. N., Maxwell, W. B., L'able, M. : J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 60, 998 (1977)
- 13) Tsukida, K., Saiki, K. : J. Vitaminol., 18, 165 (1972)
- 14) Hommes, M., vander Mijl Dekker, L. P. : Int. J. Vitam. Nutr. Res., 43, 271 (1973)
- 15) Mulder, F. J., van Strik R. : J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 61, 117 (1978)
- 16) Bell, J. G., Christie, A. A. : Analyst, 98, 268 (1973)
- 17) Kobayashi, T., Adachi, A., Furuta, K. : J. Nutr. Sci. Vitaminol., 22, 215 (1976)

- 18) 山川健重, 衣巻豊輔: ビタミン, 46, 167 (1972)
- 19) Bruchmann, E. E.: *Branntweinwirtschaft*, 75, 458 (1953)
- 20) 橋谷義孝: 酵母学, P305
- 21) 有本邦太郎・高野武悦・松岡憲固・西門義一・山下太郎・加納享一・小野忠義・佐土根範次・森喜作・宮下千篤: 日本公衆衛生雑誌, 14, 1201 (1967)
- 22) 藤田秋治・徳久幸子・道中克子・小野忠義・松浦涉: ビタミン, 40, 129 (1969)
- 23) Sahashi, Y., Suzuki, T., Higaki, M., M., Asano, T.: *J. Vitam.*, 13, 33 (1967)
- 24) Eisses, J., de Vries, H.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 52, 1189 (1969)
- 25) Panalaks, T.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, 54, 1299 (1971)
- 26) *Method of Analysis of the AOAC 12th* P259 (1975)
- 27) 牛乳・乳製品ハンドブック P31
- 28) Weckel, K. G.: *J. Dairy Sci.*, 24, 445 (1941)
- 29) Lakdawala, D. R., Widdowson, E. M.: *Lancet*, 22, 167 (1977)
- 30) LeBoulch, N., Gulat-Marnay, C., Raoul, Y.: *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 44, 167 (1974)
- 31) 高橋正脩, 桧垣宮都, 鈴木隆雄, 佐橋佳一: ビタミン, 32, 90 (1967)
- 32) Pasqualini, J. R., Jayle, M. F.: *Biochem. J.*, 81, 147 (1961)
- 33) Pasqualini, J. R., Dutter, F., Jayle, M. F.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 69, 331 (1963)
- 34) Steenbock, H., Black, A.: *J. Biol. Chem.*, 61, 405 (1924)
- 35) 小野忠義, 松浦涉, 松岡憲固, 有本邦太郎: 栄養と食糧 26, 547 (1973)
- 36) Hattinger: *Klin. Wochenschr.*, 5, 2061 (1926)
- 37) UXP XIX, P633 (1975)
- 38) 日本薬学会編“衛生試験法註解” P 155 (1973)
- 39) Mulder, F. J., deVries, E. J., Keuning, K. J.: *Pharm. Weekbl.*, 100, 1457 (1965)
- 40) Sheppard, A. J., Prosser, A. R., Hubbard, W. D.: *Method in Enzymology*, 18, part C, 356 (1971)
- 41) Bell J. G., Christie, A. A.: *Analyst*, 99, 385 (1974)